

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Expressão gênica de metaloproteinases e de seus reguladores em neoplasias mieloproliferativas: associação com biomarcadores de angiogênese e *status* mutacional

LUCIENE TEREZINA DE LIMA

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Expressão gênica de metaloproteinases e de seus reguladores em neoplasias mieloproliferativas: associação com biomarcadores de angiogênese e *status* mutacional

LUCIENE TEREZINA DE LIMA

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara
Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiola Attié de Castro

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L732e	Lima, Luciene Terezina de Expressão gênica de metaloproteinases e de seus reguladores em neoplasias mieloproliferativas: associação com biomarcadores de angiogênese e <i>status</i> mutacional / Luciene Terezina de Lima. -- São Paulo, 2016. 175p. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria Co-orientador: Castro, Fabiola Attié de 1. Hematologia 2. Expressão gênica I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador. III. Castro, Fabiola Attié de, co-orientador. 616.15 CDD
-------	--

Luciene Terezina de Lima

Expressão gênica de metaloproteinases e de seus reguladores em neoplasias mieloproliferativas: associação com biomarcadores de angiogênese e *status* mutacional

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara
Orientadora/ Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016

DEDICATÓRIA

À minha família, minha base!

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus que me ilumina e que sempre me abençoou colocando pessoas maravilhosas no meu caminho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em nome de sua diretora, Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo em nome de sua chefe, Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em nome de sua coordenadora Profa. Dra. Irene da Silva Soares.

À querida Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela sua orientação, pelo incentivo que sempre me deu e pelo exemplo de garra e luta pelos seus objetivos. Meu muito obrigado pelos conselhos, pela amizade e por todos esses anos de convívio.

À querida amiga Daniela Nunes, que me recebeu de braços abertos nesse projeto, pelo nosso grande trabalho em equipe, pelas nossas ricas discussões científicas e por todo apoio que me deu.

Ao Prof. Dr. Josef Prchal, um grande exemplo de amor pela ciência, por ter me concedido a oportunidade de desenvolver parte desse trabalho em seu laboratório na Universidade de Utah, UT, EUA. Obrigada por todos os ensinamentos e paciência.

Ao querido Guilherme Wataru Gomes, pela amizade, pelo apoio que nos deu no desenvolvimento desse projeto e pelo seu altruísmo.

À Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, pelo apoio científico e por sempre me motivar com seus conselhos.

Aos colaboradores desse projeto, Dra. Maria de Lourdes Chauffaille, Dra. Regina Régis Silva, Dr. César Cilento Ponce, Dr. Marcelo Gil Cliquet, Dr. Marcos Tadeu dos Santos, Dr. Miguel Mitne Neto, por toda a disposição e conhecimento oferecidos. Sem vocês, esse projeto não teria se realizado.

Aos pacientes que contribuíram de forma anônima para este estudo.

Ao querido Alexandre Froes Marchi, pelo amor, companheirismo e apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada.

Aos queridos Amauri Marchi e Débora Marchi pelo apoio.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo companheirismo, pela amizade, pelas risadas e por terem sido grandes alicerces em muitos momentos.

Aos colegas do Laboratório de Hematologia da Universidade de Utah, UT, EUA, especialmente à Lucie Piterková pelas sugestões no delineamento do projeto realizado no exterior, à grande amiga Sabina Swierczek pelo apoio científico, pela parceria e por me ajudar nos momentos difíceis, e à querida Jihyun Song pela paciência e ajuda nos experimentos com animais.

Aos professores Dr. Mário Hiroyuki Hirata, Dra. Rosário Domiguez Crespo Hirata e Dra. Ana Campa pela disponibilização de seus laboratórios para execução dos experimentos.

À ex-funcionária do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP Ana Maria Dantas pelos conselhos e por sempre ter me atendido com prontidão.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial à Claudinha pela alegria e amizade.

À toda minha família e amigos sempre presentes e maravilhosos.

Às amigas Marcela Bach Prieto, Maryana Branquinho e Juliana Martinez Chiozzo pela amizade e por tudo o que tenho aprendido com vocês diariamente.

Aos meus pais e meus irmãos pelo incentivo e amor!

Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 12/12957-5 e CAPES/PROEX do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas, da Universidade de São Paulo.

Durante o Doutorado, no período de abril de 2012 a novembro de 2015, recebi bolsa de Doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 141542/2012-8), com exceção do período do Doutorado sanduiche no exterior.

Parte deste trabalho foi desenvolvida na Divisão de Hematologia da Universidade de Utah, UT, Estados Unidos com Bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior- (PDSE)-CAPES/PROEX - Brasil, processo BEX4281/14-4, durante o período de 01/11/2014 a 31/10/2015. No exterior, o estudo recebeu suporte do *Myeloproliferative Disorders (MPD) Consortium research funding* do *National Institutes of Health* (NIH-P01CA108671).

RESUMO

LIMA, L.T. **Expressão gênica de metaloproteinases e de seus reguladores em neoplasias mieloproliferativas: associação com biomarcadores de angiogênese e *status* mutacional.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) *BCR-ABL1* negativas compreendem a mielofibrose primária (PMF), trombocitemia essencial (TE) e a policitemia vera (PV). A patogênese e progressão dessas NMPs não estão completamente elucidadas. As metaloproteinases de matriz (MMPs) degradam a matriz extracelular, ativando citocinas e fatores de crescimento que, por sua vez, participam da tumorigênese e angiogênese. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação da expressão gênica das MMPs, TIMPs, HIF1- α e SPARC com os marcadores angiogênicos bFGF e VEGFA em pacientes com MF e TE, considerando o *status* mutacional; bem como avaliar a regulação desses genes em camundongos submetidos à hipóxia, e em modelos *HIF1- α ^(-/-)* e *VHL^(-/-)*. Foram incluídos 21 pacientes com MF, 21 com MF pós-TE, 6 com MF pós-PV, 23 com TE e 78 indivíduos controle. As análises realizadas foram: dosagem sérica e expressão de RNAm de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC, hemograma, determinação da proteína C reativa ultrasensível, determinação das concentrações de VEGFA e bFGF e avaliação das mutações nos genes *JAK2*, *cMPL* e *CALR*. A avaliação da densidade microvascular da medula óssea foi feita em 30 dos pacientes incluídos. Os pacientes com MFP, MFPTe e TE apresentaram maior expressão de *MMP2*, *SPARC*, TIMP1, TIMP2 e bFGF quando comparados aos seus controles ($P < 0,05$), enquanto *MMP9* foi mais expressa nos pacientes com MFPTe e TE ($P = 0,011$ e $P = 0,047$, respectivamente). Os pacientes com TE apresentaram maior expressão de *HIF1- α* e VEGFA em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Pacientes com MF *JAK2^{V617F}* positivos apresentaram maiores concentrações de MMP9, TIMP2, bFGF e VEGFA quando comparados aos pacientes portadores de mutações na *CALR* ($P < 0,05$). Os pacientes com TE *JAK2^{V617F}* positivos apresentaram maiores concentrações de MMP2 e TIMP2 ($P = 0,049$ e $P = 0,020$, respectivamente). As concentrações das proteínas estudadas não apresentaram correlação com a carga alélica de *JAK2^{V617F}* e nem com a densidade microvascular da medula óssea. Células de medula óssea de camundongos submetidos à hipóxia apresentaram maior expressão de *MMP2* e *TIMP1* comparados aos camundongos em normóxia. Camundongos *VHL^(-/-)* apresentaram aumento na expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *VEGFA*. Diferentemente, embriões *HIF1- α ^(-/-)* não foram considerados um bom modelo para este estudo devido ao envolvimento das MMPs na embriogênese/organogênese. Frente aos resultados encontrados, pode-se sugerir que a maior expressão de *MMP2*, *SPARC* e de bFGF estão associadas às NMPs. A mutação *JAK2^{V617F}* foi associada a maiores concentrações de MMPs, TIMP2, VEGFA e bFGF. *HIF1- α* foi mais expresso na PV e na TE, sugerindo uma possível regulação da expressão das MMPs e TIMPs nessas doenças.

Palavras-chave: neoplasias mieloproliferativas, metaloproteinases de matriz e *status* mutacional, angiogênese

ABSTRACT

LIMA, L, T. **Gene expression of metalloproteinases and their regulators myeloproliferative neoplasms: association with angiogenesis markers and mutational status.** School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2016.

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) *BCR-ABL1*-negative include primary myelofibrosis (PMF), essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV). The mechanisms underlying the pathology and disease progression in MPN are not completely elucidated. The matrix metalloproteinases (MMPs) cleave extracellular matrix, activating cytokines and growth factors that, in turn, regulate tumorigenesis and angiogenesis. The aim of this study was to evaluate the relationship of MMPs, TIMPs, HIF1- α and SPARC gene expression with angiogenic markers bFGF and VEGFA in patients with MPN considering their mutational status; as well as to assess the regulation of these genes in animal models HIF1- α and VHL knockouts. Twenty-one MF, 21 MF post-ET, 6 MF post-PV, 23 ET patients and 78 controls were enrolled. The analysis performed in peripheral blood were: serum and mRNA expression of MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 and SPARC, blood count, high-sensitivity C-reactive protein determination and VEGFA and bFGF measurements in plasma. We also evaluate mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR*. The assessment of microvascular density (MVD) in bone marrow was performed in 30 patients. Patients with MFP, MFPET and ET presented higher expression of *MMP2*, *SPARC*, *TIMP1*, *TIMP2* and *bFGF* compared to their controls ($P < 0.05$), while *MMP9* expression was higher in patients with MFPET and ET ($P=0.011$ and $P=0.047$, respectively). Higher expression of *HIF1- α* and *VEGFA* was found in ET patients compared to the controls ($P < 0.05$). PMF *JAK2*^{V617F} patients had higher concentrations of MMP9, TIMP2, bFGF and VEGFA compared to *CALR* mutated ones ($P < 0.05$). ET patients *JAK2*^{V617F} positive had higher levels of MMP2 and TIMP2 ($P=0.049$ and $P=0.020$, respectively). The *JAK2*^{V617F} allele burden was not associated with MVD in the bone marrow. Bone marrow cells from mice in hypoxia condition showed higher *MMP2* and *TIMP1* expression compared to the control. VHL^(-/-) mice exhibited increased expression of *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* and *VEGFA*. In contrast, the HIF1- α ^(-/-) embryos were not considered an applicable model for this study due to MMPs role in embryogenesis/organogenesis. In view of these findings, we can conclude that increased expression of *MMP2*, *SPARC* and bFGF are associated with MPN. The *JAK2*^{V617F} mutation was associated with higher concentrations of MMPs, TIMP2 VEGFA and bFGF. *HIF1- α* is upregulated in PV and ET and perhaps regulate the MMPs and TIMPs expression in these diseases.

Key-words: myeloproliferative neoplasms, matrix metalloproteinases, mutational status, angiogenesis

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das neoplasias mieloproliferativas (OMS, 2008)	23
Tabela 2. Fatores de risco para mielofibrose primária segundo a classificação DIPSS-Plus	35
Tabela 3. Categorias de risco segundo a DIPSS-plus para o prognóstico da mielofibrose primária, média de sobrevida e conduta empregada em cada caso	36
Tabela 4. Critérios para o diagnóstico da mielofibrose primária (OMS, 2016)	37
Tabela 5. Critérios para o diagnóstico de trombocitemia essencial (OMS, 2016)	41
Tabela 6. Critérios diagnósticos para PV (OMS, 2016)	44
Tabela 7. Características dos ensaios <i>Taqman</i> [®] utilizados para avaliação da expressão do genes candidatos pela técnica de PCR em tempo real	60
Tabela 8. Características dos ensaios <i>Taqman</i> [®] utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real	61
Tabela 9. Características dos primers e sondas Taqman [®] empregados para quantificação dos alelos <i>JAK2</i> ^{V617F}	64
Tabela 10. Características dos primers e sondas Taqman [®] empregados para detecção das mutações <i>MPL</i> ^{W515K/L}	65
Tabela 11. Características dos primers empregados para a amplificação da região alvo no gene <i>CALR</i>	65
Tabela 12. Características gerais e clínicas dos pacientes com MF e TE e dos grupos controle incluídos no estudo	72
Tabela 13. Dados hematológicos e PCR ultrasensível dos pacientes com MF (MFP, MFPTe e MFPPV) e TE e nos indivíduos controle	73
Tabela 14. Classificação de risco DIPSS-Plus dos pacientes com mielofibrose primária	75
Tabela 15. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de pacientes com MFP	83
Tabela 16. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de controles de MFP	84
Tabela 17. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de pacientes com MFTE	85
Tabela 18. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de controles de MFTE	86
Tabela 19. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de pacientes com TE	89

Tabela 20. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de controles de TE	90
Tabela 21. Frequências de expressão de CD34 obtidas por imunohistoquímica em medula óssea de pacientes com MFP, MFPTE, MFPPV e TE	91
Tabela 22. Frequências das mutações no gene CALR nos pacientes com MF, MFPTE e TE	95
Tabela 23. Correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de MMP2, MMP9, TIMP2, VEGFA e FGF e a carga alélica de $JAK2^{V617F}$ em pacientes com MFP, MFPTE e TE	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da JAK2	25
Figura 2. Mecanismo de ativação da via de sinalização JAK2 por mutações no gene <i>JAK2</i>	26
Figura 3. Fisiopatologia, principais manifestações clínicas e complicações comuns de MF	33
Figura 4. Estrutura das MMPs. (A) Domínios Estruturais das MMPs. (B) Representação esquemática das MMPs com seus diferentes domínios estruturais	48
Figura 5. Regulação dependente de oxigênio de HIF α e seus genes alvo	52
Figura 6. Interação das MMPs, HIF1- α , TIMPs e SPARC com os fatores angiogênicos VEGF e bFGF	54
Figura 7. Colônia eritroide BFU-E, após 14 dias em cultura com 3.000 mU/mL EPO. Fotomicrografia obtida com aumento de 40 vezes	68
Figura 8. Expressão de RNAm dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC nos pacientes com MF (MFP, MFPTe e MFPPV) e grupo controle	77
Figura 9. Expressão de RNAm do gene HIF1- α nos pacientes com MF (MFP, MFPTe e MFPPV) e grupo controle	78
Figura 10. Concentrações séricas das proteínas MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 e plasmáticas de VEGFA e FGF nos pacientes com MF e grupo controle	79
Figura 11. Expressão de RNAm e concentração das proteínas segundo a classificação DIPSS-plus em pacientes com MFP	81
Figura 12. Expressão de RNAm dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC e HIF1- α nos pacientes com TE e grupo controle	87
Figura 13. Concentrações das proteínas MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC, VEGFA e FGF nos pacientes com TE e grupo controle	88
Figura 14. Expressão de RNAm de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC e HIF1- α e concentrações das proteínas MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC HIF1- α , VEGFA e FGF, segundo a expressão de CD34 em biópsias de medula óssea dos pacientes com MFP	92
Figura 15. Expressão de RNAm de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC e HIF1- α e concentrações das proteínas MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC HIF1- α , VEGFA e FGF, segundo a expressão de CD34 em biópsias de medula óssea dos com MFTE	93
Figura 16. Expressão de RNAm de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC e HIF1- α e concentrações das proteínas MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC HIF1- α , VEGFA e FGF, segundo a expressão de CD34 em biópsias de medula óssea dos TE	94
Figura 17. Concentração das proteínas MMP2, MMP9, TIMP2, VEGFA e FGF nos pacientes	

com MFP, MFPTe e TE segundo o status mutacional	96
Figura 18. Expressão de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 em granulócitos e plaquetas de pacientes com Trombocitemia essencial, Mielofibrose, Policitemia vera e controles	98
Figura 19. Expressão de HIF1- α em granulócitos e plaquetas de pacientes com MF, TE, PV e controles saudáveis	99
Figura 20. Expressão de MMP9, TIMP1 e TIMP2 em BFU-E submetidas a hipóxia e normóxia	100
Figura 21. Expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e HIF1- α em amostras de medula de óssea de camundongos C57Bl/6 submetidos a 4 dias de hipóxia comparados aos camundongos em normóxia	101
Figura 22. Expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e HIF1- α em amostras de medula de óssea de camundongos C57Bl/6 submetidos a 10 dias de hipóxia comparados aos camundongos em normóxia. A) Separação das células LSK da medula óssea; B) Células LSK; C) Células Duplo-negativas (Sca- e cKit-), D) Células Linhagem positiva ...	102
Figura 23. Expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e HK1 em embriões de camundongos selvagens (WT) e nocaute para HIF1- α	103
Figura 24. Expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e HK1 em fígado de camundongo Chuvash VHL (-/-) e selvagem (WT)	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB: *Beta-actin*

AKT: *Thymoma viral proto-oncogene*

B2M: *Beta-2-microglobulin*

BCR-ABL1: *Breakpoint cluster region- c-abl oncogene 1*

bFGF: *Basic fibroblast growth factor*

BMP: *Bone morphogenic protein*

CALR: Calreticulina

CTH: Célula troco hematopoética

DEPC: Dietilpirocarbonato

DHL: Desidrogenase Láctica

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EPO: Eritropoetina

ERK1: *Extracellular signal-regulated kinase 1*

FGFR1: *Fibroblast growth factor receptor 1*

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

HIF: *Hypoxia-inducible factor*

HMBS: Hidroximetilbilano sintase

HPRT1: Hipoxantina fosforibosiltransferase 1

IL: interleucina

JAK2: *Janus kinase 2*

LLA: Leucemia linfoblástica aguda

LLC: Leucemia linfocítica crônica

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crônica

LSK Precursor: LinSCA-1+ c-KIT+

Lin-: Negativo para marcadores de linhagens celulares hematopoéticas diferenciadas

MAPK: *Mitogen activated kinase-like protein*

MEC: Matriz extracelular

MF: Mielofibrose

MPF: Mielofibrose primária

MFPTTE: Mielofibrose pós trombocitemia essencial

MFPPV: Mielofibrose pós policitemia vera

MLL: *Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*

MMP: *Matrix metalloproteinases*

MPL: *Myeloproliferative leukemia virus oncogene*

NMP: Neoplasia Mieloproliferativa

OMS: Organização Mundial Da Saúde

Pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase chain reaction*

PCRus: Proteína C reativa ultrasensível

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PDGFRA: *Platelet-derived growth factor receptor alpha*

PDGRRB: *Platelet-derived growth factor receptor beta*

PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PV: Policitemia vera

SMD: Síndrome mielodisplásica

SOCS: *Suppressor of cytokine signaling*

SPARC: *Secreted protein acidic and rich in cysteine*

STAT: *Signal-transducer and activator of transcription*

TE: Trombocitemia essencial

TET2: *Tet methylcytosine dioxygenase 2*

TGF- β : *Transforming growth factor-beta*

TIMPs: *Tissue inhibitors of metalloproteinases*

TPO: Trombopoetina

UBC: Ubiquitina C

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR1: VEGF receptor 1

VEGFR2: VEGF receptor 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Mutações no gene <i>JAK2</i>	24
2.2 Mutações no gene <i>MPL</i>	28
2.3 Mutações no gene <i>CALR</i>	28
2.4 Outras mutações	30
2.5 Mielofibrose primária (MF).....	31
2.6 Trombocitemia essencial.....	38
2.7 Policitemia vera	42
2.8 Metaloproteinases de matriz.....	46
2.9 Proteína ácida secretada e rica em cisteína (SPARC).....	50
2.10 Fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1)	51
3 OBJETIVOS.....	55
3.1 Objetivo Geral	55
3.2 Objetivos Específicos	55
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	56
4.1 Casuística	56
4.1.1 Pacientes com MF e TE.....	56
4.1.2 Controles	56
4.1.3 Aspectos Éticos	57
4.2 Amostras biológicas	57

4.3 Métodos	58
4.3.1 Determinação do hemograma e Proteína C Reativa ultrasensível (PCRus)	58
4.3.2 Dosagem das concentrações plasmáticas de VEGFA e bFGF	58
4.3.3 Dosagem das concentrações séricas de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC	58
4.3.4 Extração e avaliação da qualidade de RNA total da medula óssea e do sangue periférico e síntese de DNA complementar (cDNA)	59
4.3.5 Escolha do gene de referência.....	59
4.3.6 Quantificação e análise da expressão de RNAm dos genes <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TIMP1</i> , <i>TIMP2</i> , <i>SPARC</i> e <i>HIF1-α</i> por PCR em tempo real.....	61
4.3.7 Mielograma e/ou biópsia da medula óssea	62
4.3.8 Análise citogenética para pesquisa de alterações cromossomais	62
4.3.9 Análises imunohistoquímicas	62
4.3.10 Extração e avaliação do DNA genômico	63
4.3.11 Avaliação da mutação e quantificação dos alelos (<i>allele burden</i>) <i>JAK2</i> ^{V617F}	64
4.3.12 Detecção das mutações W515K e W515L no gene <i>MPL</i> nos pacientes negativos para a mutação <i>JAK2</i> ^{V617F}	64
4.3.13 Amplificação e sequenciamento do gene <i>CALR</i>	65
4.3.14 Separação dos granulócitos e plaquetas de pacientes com MF, TE e PV e indivíduos do grupo controle	67
4.3.15 Avaliação <i>in vitro</i>	68
4.3.16 Avaliação em modelos animais: in vivo	69
4.4 Análises Estatísticas	70
5 RESULTADOS	71

5.1 Dados dos pacientes com MF e TE e indivíduos controle	71
5.2 Pacientes com cariótipo alterado.....	74
5.3 Avaliação do prognóstico dos pacientes com mielofibrose primária	75
5.4 Expressão de RNAm e dosagem das concentrações de MMPs, TIMPs, SPARC, b-FGF e VEGFA nos casos e controles.....	76
5.4.1 Mielofibrose	76
5.4.2 Trombocitemia essencial	87
5.5 Expressão de CD34 em biópsias de medula óssea de pacientes com MF e TE.....	91
5.6 Concentrações séricas de MMP2, MMP9, TIMP 1 e TIMP 2 e plasmáticas de VEGF e FGF em pacientes com MFP, MFPTe e TE segundo o <i>status</i> mutacional	95
5.7 Expressão gênica de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e HIF1- α em granulócitos e plaquetas de pacientes com MF, TE, PV e controles saudáveis.....	97
5.8 Análise da expressão gênica de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 em colônias BFU-E submetidas a hipóxia e normóxia	100
5.9 Análise da expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 e HIF1- α em medula óssea de camundongos C57Bl/6.....	100
5.10 Análise da expressão dos genes <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TIMP1</i> , <i>TIMP2</i> e <i>HIF1-α</i> em células LSK da medula óssea de camundongos C57Bl/6 submetidos a 10 dias de hipóxia	101
5.11 Análise da expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e HK1 em embriões de camundongos selvagens (WT) e nocaute para HIF1- α	103
5.12 Análise da expressão dos genes <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> , <i>TIMP1</i> , <i>TIMP2</i> e <i>HK1</i> em camundongo VHL ^(-/-) e selvagem (WT).....	104
6 DISCUSSÃO.....	105
7 CONCLUSÃO	114

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
APÊNDICES.....	135
ANEXOS.....	137

1 INTRODUÇÃO

A mielofibrose primária (MF), a trombocitemia essencial (TE) e a policitemia vera (PV) são neoplasias mieloproliferativas (NMPs), doenças clonais da célula-tronco hematopoética, caracterizadas pela elevada proliferação de células de uma ou mais linhagens mieloides com maturação preservada (Spivak, 2004; Kralovics, 2012).

Vários estudos têm sido realizados para melhor compreensão da patogênese das NMPs. Ainda não se esclareceu se esse processo é um evento oncogênico independente ou se seria consequência de proliferação clonal hematopoética (Medinger *et al.*, 2009).

A angiogênese é um processo complexamente regulado de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Carmeliet, 2005) e possui papel importante na patogênese de várias doenças hematológicas, inclusive das NMPs (Lundberg *et al.*, 2000; Wróbel *et al.*, 2003; Kvasnicka e Thiele, 2004; Panteli *et al.*, 2004; Alonci *et al.*, 2008; Carmeliet e Jain, 2011).

Dentre as várias citocinas e fatores de crescimento que modulam a angiogênese, destacam-se o fator de transformação do crescimento (TGF)- β 1, o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (Massagué, Blain e Lo, 2000; Ferrara, 2004), o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF2/ bFGF) e o fator induzido por hipóxia (HIF)-1 (Folkman, 1992; Polverini, 1995).

As metaloproteinases de matriz (MMPs), seus inibidores (TIMPs), a proteína secretada ácida rica em cisteína (SPARC) e HIF1- α são também proteínas importantes que participam do processo de angiogênese e interagem com TGF- β 1, VEGFA e bFGF.

Há poucos estudos publicados que analisaram esses genes e/ou proteínas nas NMPs BCR-ABL1 negativas, com o principal foco na associação com a fisiopatologia ou com o processo de fibrose medular (Jensen *et al.*, 2003).

O presente trabalho visou compreender: 1) a potencial associação das MMPs, TIMPs, SPARC e HIF1- α com os marcadores de angiogênese VEGFA e bFGF bem como a associação das concentrações séricas/plasmáticas dessas proteínas e o *status* mutacional em pacientes com NMPs; 2) a interação do HIF-1 α e a expressão de metaloproteinases de matriz e seus inibidores em modelos *in vitro* e *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs), antigamente denominadas doenças mieloproliferativas crônicas, são doenças clonais de célula-tronco hematopoética, nas quais há proliferação aumentada das séries mieloides com maturação eficaz, que pode levar à leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocitária ou trombocitose. Várias NMPs progridem para fibrose medular ou leucemia (Swerdlow *et al.*, 2008).

As NMPs foram descritas pela primeira vez por William Dameshek em 1951 como doenças mieloproliferativas. Eram elas a mielofibrose primária (MF), a trombocitemia essencial (TE), a policitemia vera (PV) e a leucemia mieloide crônica (LMC). Tais doenças foram originalmente agrupadas com base no seu fenótipo comum de mieloproliferação. Desde então, importantes descobertas foram feitas e a identificação das proteínas com atividade de tirosinoquinases, tais como da família JAK (*Janus kinases*), representou um marco na elucidação da patogênese desses distúrbios (Wadleigh e Tefferi, 2010).

Na classificação de 2008 da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças mieloproliferativas crônicas foram classificadas como NMPs (**Tabela 1**). A nomenclatura foi alterada devido à mieloproliferação ser neoplásica, e não reativa. Tal classificação foi influenciada por dois importantes fatores: (1) uso da biologia molecular para a detecção de marcadores genéticos nas NMPs BCR-ABL1 negativas e (2) uso da caracterização histológica para ajudar na identificação dos subtipos das NMPs (Swerdlow *et al.*, 2008).

Tabela 1. Classificação das neoplasias mieloproliferativas (OMS, 2008)**Neoplasias mieloproliferativas (NMPs)**

Leucemia mieloide crônica BCR-ABL1 positiva
 Leucemia neutrofílica crônica
 Policitemia vera
 Mielofibrose primária
 Trombocitemia essencial
 Leucemia eosinofílica crônica não especificada
 Mastocitose
 NMPs não classificáveis

Neoplasias linfoides e mieloides associadas com eosinofilia e anormalidades de PDGFRA, PDGRRB ou FGFR1*Síndromes Mielodisplásicas/ Neoplasias Mieloproliferativas (SMD/NMP)*

Leucemia mielomonocítica crônica
 Leucemia mielomonocítica juvenil
 Leucemia mieloide crônica atípica BCR-ABL negativa
 Anemia refratária com sideroblastos em anel associados com marcada trombocitose (RARS-t)

Síndromes Mielodisplásicas (SMD)

BCR-ABL1: gene de fusão resultante da translocação t(9;22)(q34;q11). PDGFRA: receptor alfa de crescimento derivado de plaqueta; PDGRRB: receptor beta de crescimento derivado de plaqueta; FGFR1: receptor 1 do fator de crescimento de fibroblasto. Adaptado de Swerdlow et al., 2008

As bases moleculares das NMPs BCR-ABL1 negativas permaneceram desconhecidas por décadas até que, em 2005, quatro grupos de pesquisa identificaram a mutação de ponto no gene *Janus kinase 2 (JAK2)* na maioria dos pacientes com essas doenças (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005).

As mutações em NMPs geralmente são exclusivas não aparecendo concomitante no mesmo paciente. Elas estão presentes no gene *JAK2* (localizado no cromossomo 9p24) (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005), *MPL (myeloproliferative leukemia virus oncogene)*; localizado no cromossomo 1p34) (Pikman *et al.*, 2006) e *CALR* (calreticulina; localizado no

cromossomo 19p13.2) (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013) e contabilizam 90 a 97% de frequência nas NMPs.

A sinalização desregulada na via JAK-STAT é reconhecida como o mecanismo central da fisiopatologia das NMPs além da mieloproliferação aberrante (Quintás-Cardama *et al.*, 2011a). Acredita-se que as mutações em *JAK2* e *MPL* ativam diretamente a via JAK-STAT enquanto as mutações no gene *CALR* façam o mesmo, mas de maneira indireta (Tefferi, 2015).

2.1 Mutações no gene *JAK2*

A *JAK2* é uma tirosinoquinase capaz de ativar STAT5 quando estimulada por receptores de citocinas tais como a eritropoietina (EPO) e a trombopoetina (TPO) (EPO-R e c-MPL, respectivamente) (Levine *et al.*, 2007).

A *JAK2* é membro de uma grande família de tirosinoquinasas envolvidas na sinalização de receptores de citocinas, a qual inclui *JAK1*, *JAK3* e *TYK2* (tirosinoquinase 2) (Quintás-Cardama *et al.*, 2011b). A *JAK2* é essencial para a sinalização de receptores de fatores de crescimento hematopoéticos, como os receptores de EPO, TPO, fator estimulante de colônia granulocítico-macrofágico (GM-CSF), interleucina (IL)-3 e IL-5 (Meyer e Levine, 2014).

Estruturalmente, a *JAK2* possui sete domínios homólogos, denominados de JH1 a JH7 (**Figura 1**). O domínio JH1 (quinase), localizado na posição C-terminal, é o responsável pela atividade catalítica da enzima e o domínio JH2 (pseudoquinase) é homólogo ao domínio JH1, porém, não apresenta atividade catalítica e é essencial para a modulação da atividade do domínio quinase. Os domínios JH3-JH4 compartilham homologia com o domínio SH2 (do inglês, *Src homology*) das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT). Por fim, o domínio amino terminal JH4-JH7 é conhecido como FERM (do inglês, *four-one, ezrin, radixin and moesin*), e corresponde à região de ligação ao receptor de citocinas (Levine *et al.*, 2007; Vainchenker e Constantinescu, 2013; Babon *et al.*, 2014).

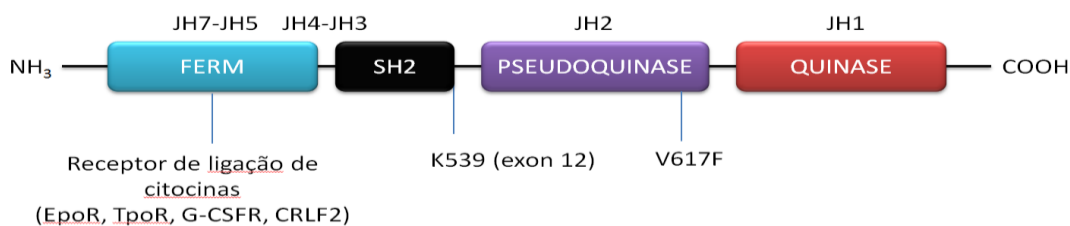


Figura 1. Representação da estrutura da JAK2

A proteína JAK2 possui um domínio tirosinoquinase (JH1), um domínio pseudoquinase (JH2), um domínio SH2 (JH3-JH4) e um domínio *four-one, ezrin, radixin and moesin* (FERM). O domínio pseudoquinase previne a ativação do domínio quinase. Os domínios JH3-JH4 compartilham homologia com o domínio SH2 da proteína STAT. O domínio FERM é responsável pela ligação aos domínios citosólicos dos receptores de citocinas. Adaptado de Vainchenker e Constantinescu, 2013

A transdução de sinal das citocinas, dos fatores de crescimento hematopoéticos e de seus receptores é essencial para a proliferação coordenada e diferenciação das linhagens celulares a partir da célula pluripotente hematopoética (Campbell e Green, 2006; Levine *et al.*, 2007; Quintás-Cardama *et al.*, 2011b).

Os receptores de citocinas compreendem duas ou mais subunidades, cada uma associada a um monômero de JAK. Após a ligação da citocina a seu receptor apropriado, as subunidades do receptor são reorientadas ou oligomerizadas, facilitando a transfosforilação das JAKs e ativando-as. Em seguida, as JAKs ativadas fosforilam resíduos de tirosina em regiões citoplasmáticas do receptor de citocinas, gerando sítios de ligação para proteínas que contêm domínios de reconhecimento de fosfotirosinas (na qual estão inclusas as STATs). As STATs são então fosforiladas e se dimerizam, sendo translocadas para o núcleo para iniciar a transcrição de genes efetores envolvidos na regulação do ciclo celular, na apoptose e na degradação proteossomal (Meyer e Levine, 2014) (**Figura 2**).

A expressão contínua de JAK2 aumenta a atividade das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-x e aumenta a expressão das ciclinas D1/2 e Cdc25A promovendo a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (Gautier *et al.*, 2012; Meyer e Levine, 2014). A proteína JAK2 também ativa as vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfaditilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt, que promovem proliferação e sobrevivência celulares (James *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2007; Meyer e Levine, 2014).

Além de ativar a via de sinalização JAK-STAT, a proteína JAK2 também é capaz de translocar-se ao núcleo, fosforilando as histonas H3 e Y41, o que leva ao

deslocamento da heterocromatina proteína 1 e PRMT5, uma histona arginina metiltransferase (Dawson *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Entretanto, o impacto da JAK2 sobre as funções do ciclo celular ainda não é completamente compreendido.

A regulação negativa da via JAK-STAT ocorre pela expressão de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS) que competem com as STATs pela ligação ao receptor de citocina, promovendo a degradação proteassomal de JAK2 por ubiquitinação e consequentemente interferindo na atividade catalítica via interação com o domínio quinase (Haan *et al.*, 2009). A JAK2 também é negativamente regulada pela proteína *Casitas B-cell lymphoma* (CBL), que age como ubiquitina ligase para várias tirosinoquinases, e pela proteína adaptadora LNK (do inglês, *lymphocyte adaptor protein*), que sequestra JAK2 (Tong, Zhang e Lodish, 2005) (Figura 2).

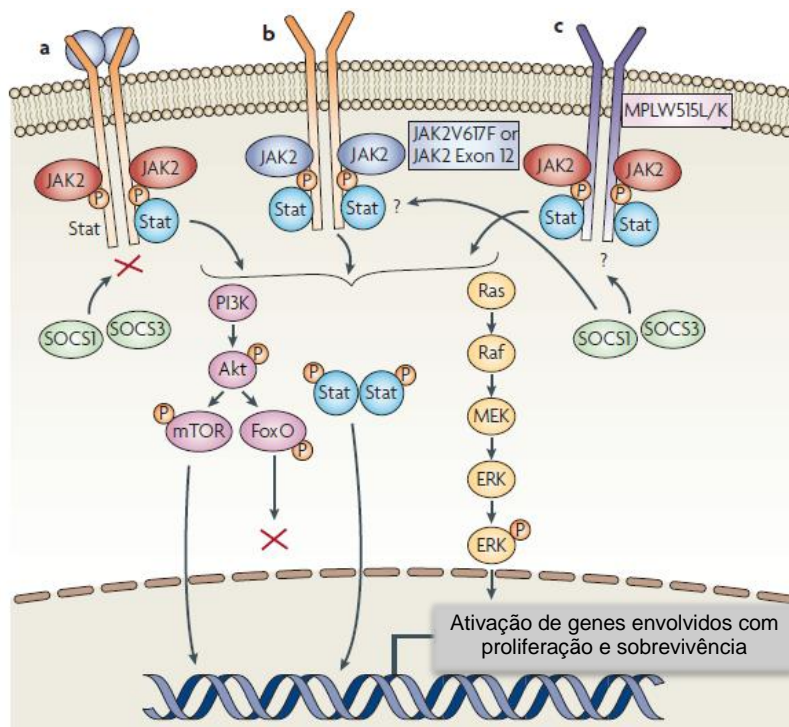


Figura 2. Mecanismo de ativação da via de sinalização JAK2 por mutações no gene *JAK2*

(a) Citocinas ligadas aos seus receptores provocam a fosforilação da Janus quinase 2 (JAK2) e o recrutamento de proteínas sinalizadoras STAT e consequente fosforilação e ativação das vias de sinalização subsequentes, incluindo os fatores de transcrição STAT, MAPK e PI3K-Akt. (b) Os receptores com mutação *JAK2*^{V617F} e *JAK2* éxon 12 são fosforilados na ausência de ligante, e conduzem a ativação constitutiva da via de sinalização. (c) Por outro lado, os receptores de trombopoietina com mutação *MPL*^{W515L/K} são capazes de fosforilar JAK2 selvagem na ausência de trombopoietina resultando na ativação de vias de sinalização seguintes. A regulação negativa da sinalização JAK2 é normalmente mediada pelas proteínas supressoras de sinalização SOCS1 e SOCS3. A *JAK2*^{V617F} pode escapar do *feedback* negativo mediado por SOCS3. Adaptado de Levine *et al.*, 2007

A mutação $JAK2^{V617F}$ consiste em uma troca do nucleotídeo G por T na posição 1849 no éxon 14 do gene, o que resulta na substituição de um aminoácido valina por uma fenilalanina na posição 617 da proteína (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005). Tal mutação resulta na ativação constitutiva do gene $JAK2$, que promove a ação contínua das cascatas de sinalização subsequentes envolvidas com os processos de apoptose, ciclo e diferenciação celular (Levine *et al.*, 2006) (**Figura 2**). Posteriormente em 2007, outras mutações no éxon 12 do gene $JAK2$ também foram descritas nos pacientes com PV $JAK2^{V617F}$ negativos (Scott *et al.*, 2007).

A mutação $JAK2^{V617F}$ está presente em cerca de 97% dos casos de PV e em aproximadamente 60% dos casos de MF e TE (Hubbeling, Frank e Hexner, 2012). A prevalência da mutação $JAK2^{V617F}$ na população brasileira é de 96% para PV, 56% para MFP e 28% para TE (Monte-Mór *et al.*, 2007). Os pacientes com PV, negativos para $JAK2^{V617F}$ (3%) correspondem aos casos com mutações no éxon 12 do gene $JAK2$ ou negativos para mutação (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2007). A presença de $JAK2^{V617F}$ está incluída nos critérios de classificação e diagnóstico das NMP revisto pela OMS (2016) como um dos principais critérios de diagnóstico de PV, e é considerado marcador clonal de TE e MF (Arber, *et al.*, 2016).

A mutação $JAK2^{V617F}$ pode estar presente em heterozigose ou homozigose, e também pode evoluir para a homozigose por recombinação mitótica, resultando em evento de dissomia uniparental. A carga alélica da mutação $JAK2$ parece estar associada com a progressão da TE e PV para MF ou com os fenótipos da doença e a um pior prognóstico (Alshemmari *et al.*, 2013). A razão pela qual a mesma mutação $JAK2^{V617F}$ provoca aparentemente três fenótipos diferentes, MF, PV ou TE, ainda não está clara (Skoda, 2007), bem como o mecanismo que conduz aos fenótipos de fibrose medular, hematopoese extramedular, citopenias e transformação leucêmica (Fleischman e Maziarz, 2013).

2.2 Mutações no gene *MPL*

O gene *MPL* codifica o receptor da trombopoetina (TPO) e possui 12 éxons distribuídos em 17kb de DNA (Le Coniat *et al.*, 1989). A TPO é um fator de crescimento que regula a produção de progenitores hematopoéticos multipotentes e plaquetas.

Em 2006, as mutações somáticas *MPL*^{W515L/K} foram descritas em pacientes com MF *JAK2*^{V617F} negativos (Pikman *et al.*, 2006). Tais mutações ocorrem no éxon 10 do gene, resultando na substituição de um triptofano por uma leucina ou por uma lisina no códon 515 da região transmembrana da proteína. O aminoácido 515 está localizado num trecho de cinco aminoácidos [[K/R]WQFP] e possui papel relevante na conformação do receptor de *MPL* no citosol (*cMPL*) e previne sua ativação espontânea (Staerk *et al.*, 2006; Pecquet *et al.*, 2010)

O mecanismo pelo qual a TPO ativa seu receptor parece ser semelhante ao de outras citocinas hematopoéticas, que se ligam e induzem a homodimerização do receptor (Mignotte *et al.*, 1994).

2.3 Mutações no gene *CALR*

O gene *CALR* codifica a calreticulina, proteína com múltiplas funções, localizada primariamente no lúmen do retículo endoplasmático, no qual apresenta funções de chaperona. Essa proteína tem uma importante função na homeostase do cálcio, e provavelmente possui um papel na regulação da transcrição, visto ser também encontrada no núcleo celular (Burns *et al.*, 1994). Os genes alvo da calreticulina ainda não são conhecidos; porém, há evidências de seu envolvimento na apoptose e na regulação da sobrevivência celular em células cancerígenas por meio da promoção de atividade antitumoral na capacidade pró fagocítica de macrófagos (Chao *et al.*, 2010).

Em 2013, foram descritas mutações no éxon 9 no gene *CALR* na maioria dos pacientes com TE e MF negativos para as mutações nos genes *JAK2* e *MPL* sugerindo que estas mutações desempenham importante papel na patogênese das NMPs *JAK2* negativas (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013). Conseqüentemente, devido a essa importância, a análise de *CALR* foi incluída nos critérios diagnósticos da OMS para as NMPs (Arber, *et al.*, 2016).

As mutações no éxon 9 no gene *CALR* consistem em inserções ou deleções que resultam em modificação na parte C-terminal da proteína. Os últimos 4 aminoácidos (KDEL), que contêm o sinal para a retenção no retículo endoplasmático, se tornam positivamente carregados resultando em perda da função da proteína e consequente incorreta localização celular (Klampfl *et al.*, 2013). Mais de 50 tipos de mutações foram detectadas, sendo as variantes do tipo 1 (p.L367fs*46), que consiste na deleção de 52 pb, e tipo 2 (p.K385fs*47), que consiste na inserção de 5pb TTGTC, as mais frequentemente encontradas (Cazzola e Kralovics, 2014). Apesar de os efeitos fisiológicos dessas alterações não terem sido esclarecidos ainda, os primeiros estudos sugerem uma implicação na fosforilação de STAT5 (Klampfl *et al.*, 2013).

Com raras exceções, as mutações em *CALR* e *MPL* estão ausentes na PV (Pardanani *et al.*, 2011; Broséus, Park, *et al.*, 2014) e suas frequências são de aproximadamente 20 a 25% e 3 a 4%, respectivamente em TE, e 20 a 25% and 6 a 7% respectivamente na MF (Tefferi, Guglielmelli, *et al.*, 2014). Em estudo prévio de nosso grupo, foram encontradas mutações no gene *CALR* em pacientes *JAK2* e *MPL* negativos, sendo as frequências de 38% em pacientes com MF, 33% com MFPTe e 13% com TE. As mutações mais frequentes foram as dos tipos 1 e 2. Apenas um paciente apresentou a mutação do tipo 32 (1153_1154AA>TGTC) e outro uma deleção (1125delA*), descrita primeiramente por nosso grupo (Nunes *et al.*, 2015). Numa coorte de 73 pacientes com NMPs, outro grupo mostrou que a frequência de mutações no gene *CALR* na população brasileira é de 33% em pacientes com MF e 41% em pacientes com TE sendo que as mais frequentes foram as do tipo 1 e tipo 2. Os pacientes com PV não apresentaram mutações na *CALR* (Machado-Neto *et al.*, 2015).

A coexistência das mutações *JAK2*^{V617F} e *CALR* foi encontrada em raros casos de anemia refratária com sideroblastos em anel associada com trombocitose evidente (Broséus, Lippert, *et al.*, 2014), PV (Xu *et al.*, 2015), MF (Tefferi, Lasho, *et al.*, 2014) e TE (Lundberg *et al.*, 2014; Mcgaffin *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015).

Embora as mutações somáticas *JAK2*^{V617F} e em *CALR* sejam bastante frequentes entre os pacientes com MF (>75% dos casos), uma proporção é negativa para as três mutações (*JAK2*^{V617F}, *MPL*^{W515K/L} e *CALR*), sendo estes pacientes denominados triplo-negativos, e mesmo aqueles que as apresentam, tal fato não

parece iniciar a doença (Tefferi, 2010; Vainchenker e Constantinescu, 2013; Tefferi, Guglielmelli, *et al.*, 2014). Mais recentemente, o sequenciamento de exoma completo revelou a presença de outras variantes nos genes *MPL* ou *JAK2* em pacientes com MF e TE, sugerindo que os triplo-negativos não representam um grupo homogêneo de pacientes (Milosevic Feenstra *et al.*, 2015).

2.4 Outras mutações

O genoma de pacientes com NMPs tem sido extensivamente sequenciado em busca de novas mutações que expliquem a fisiopatologia dessas doenças (Lundberg *et al.*, 2014). Interessantemente, muitas mutações são encontradas ao diagnóstico e apenas duas mutações somáticas foram descritas durante o curso da doença em uma coorte de 133 pacientes (Lundberg *et al.*, 2014). De uma maneira geral, as células neoplásicas nas NMPs tendem a ser estáveis do ponto de vista genômico. O resultado clínico pode ser predito pelas mutações encontradas ao diagnóstico, de modo que, quanto mais mutações encontradas, pior é o prognóstico (Lundberg *et al.*, 2014). Foram descritas mutações na proteína adaptadora LNK [Homologia 2-B3 de Scr (SH2B3)], que resultam na perda de função da proteína, responsável por regular negativamente a sinalização de EPO e TPO por meio da inibição de *JAK2* (Lasho, Pardanani e Tefferi, 2010; Oh *et al.*, 2010); e mutações nos genes de SOCS, que regulam negativamente a via JAK-STAT (Krebs e Hilton, 2000).

Além disso, mutações que afetam genes envolvidos com a regulação epigenética tais como *Cbl proto-oncogene*, *E3 ubiquitin protein ligase (CBL)*, *tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)*, *splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1)*, *serine/arginine-rich splicing factor 2 (SRSF2)*, *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)*, *isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1/2)*, *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit (EZH2)* e *additional sex combs like 1, transcriptional regulator (ASXL1)* ou genes envolvidos na regulação da apoptose, tal como o *tumor protein p53 (TP53)*, também têm sido descritas (Passamonti, Mora e Maffioli, 2016).

As mutações em TET2, enzima envolvida na desmetilação do DNA, foram as primeiras descritas em neoplasias mieloides em 2009, especialmente em pacientes

JAK2^{V617F} heterozigotos (Delhommeau *et al.*, 2009). As mutações *TET2* podem ocorrer antes ou depois de mutações condutoras (*JAK2*^{V617F}, *MPL*^{W515L/K}), originando vários clones ao mesmo tempo (Lundberg *et al.*, 2014; Ortmann *et al.*, 2015). A perda da função de *TET2* induz o aumento da proliferação de células tronco hematopoéticas (CTH) e confere a CTH *JAK2*^{V617F} uma vantagem competitiva sobre a CTH *JAK2*^{V617F}/*TET2* tipo selvagem (Moran-Crusio *et al.*, 2011; Kameda *et al.*, 2015; Ortmann *et al.*, 2015). Ainda é controverso se as mutações em *TET2* estão associadas com o alto risco a transformação (Tefferi *et al.*, 2009; Lundberg *et al.*, 2014), mas a ordem da ocorrência entre *TET2* e *JAK2*^{V617F} impacta nos efeitos biológicos e clínicos da doença (Ortmann *et al.*, 2015). Já as mutações nos genes *ASXL1* ou *SRSF2* foram associadas a pior sobrevida em pacientes com MFP, independente da classificação de risco DIPSS-plus (Passamonti, Mora e Maffioli, 2016).

Mutações na DNA metiltransferase *DNMT3A* também tem sido encontradas em cerca de 5% dos pacientes com NMPs (Abdel-Wahab *et al.*, 2011; Lundberg *et al.*, 2014).

Mutações com perda de função de *EZH2* têm sido encontradas em alguns casos NMP (3 %) (Ernst *et al.*, 2010; Lundberg *et al.*, 2014). A *EZH2* é uma metiltransferase de histona, que induz a formação de heterocromatina e participa na repressão gênica. Outras mutações em genes *IDH1/2*, *TP53* tem sido associadas com a transformação para leucemia mieloide aguda (LMA) (Green e Beer, 2010; Harutyunyan *et al.*, 2011).

As NMPs podem ser associadas com mutações em *TP53* heterozigotas, enquanto aquisição de homozigose ou mutação de outros alelos *TP53* está associada com a transformação para LMA (Lundberg *et al.*, 2014).

A seguir serão apresentadas a epidemiologia, aspectos clínicos, diagnóstico, fisiopatologia e tratamentos das NMPs BCR-ABL1 negativas: MF, TE e PV.

2.5 Mielofibrose primária (MF)

A MF foi anteriormente denominada mielofibrose crônica idiopática, metaplasia mieloide agnogênica, mielofibrose com metaplasia mieloide, dentre outras denominações (Mesa *et al.*, 2007). A MF é uma doença clonal originada da

transformação neoplásica de célula hematopoética pluripotente (célula-tronco), acompanhada de alterações reacionais intensas do estroma medular, com fibrose colagênica, osteosclerose e angiogênese (Mesa *et al.*, 2007).

Quanto à fisiopatologia, a MF parece resultar da transformação da célula-tronco hematopoética, que conduz ao aumento de megacariócitos e de monócitos que, por sua vez, liberam fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (Fleischman e Maziarz, 2013).

A fibrose na MF é considerada um processo de resposta de fibroblastos normais às citocinas produzidas pelos megacariócitos (Stein e Moliterno, 2010). Ocorre hipersensibilidade das células hematopoéticas às citocinas e diminuição da expressão do receptor de trombopoetina (MPL) em plaquetas e megacariócitos. Outra importante característica da MF é a presença de concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias associadas ao aumento da fibrose medular, sintomas constitucionais, esplenomegalia e hematopoese extramedular (**Figura 3**) (Tefferi, Vaidya, *et al.*, 2011; Hasselbalch, 2012; Vaidya *et al.*, 2012). A IL-8 também exerce importante papel no microambiente do tumor, contribuindo para a neoangiogênese (Vaugh e Wilson, 2008). Concentrações elevadas de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), de FGF básico (bFGF), e VEGF contribuem para o processo de fibrose da medula e angiogênese (Le Bousse-Kerdilès e Martyré, 1999; Hasselbalch *et al.*, 2011). Há ainda a descrição da potencial relação entre a concentração do VEGF medular com a densidade microvascular, parâmetros prognósticos estabelecidos do estágio fibrótico, alterações cromossômicas e sobrevida do paciente (Steurer *et al.*, 2007). Na MF, a fibrose progressiva da medula óssea pode ser causada por sinergismo entre a síntese aumentada de fibronectina e das citocinas pró-inflamatórias tais como o fator transformador de crescimento (TGF- β 1), IL-1 e a substância P em monócitos (Chang, Yook e Rameshwar, 2013).

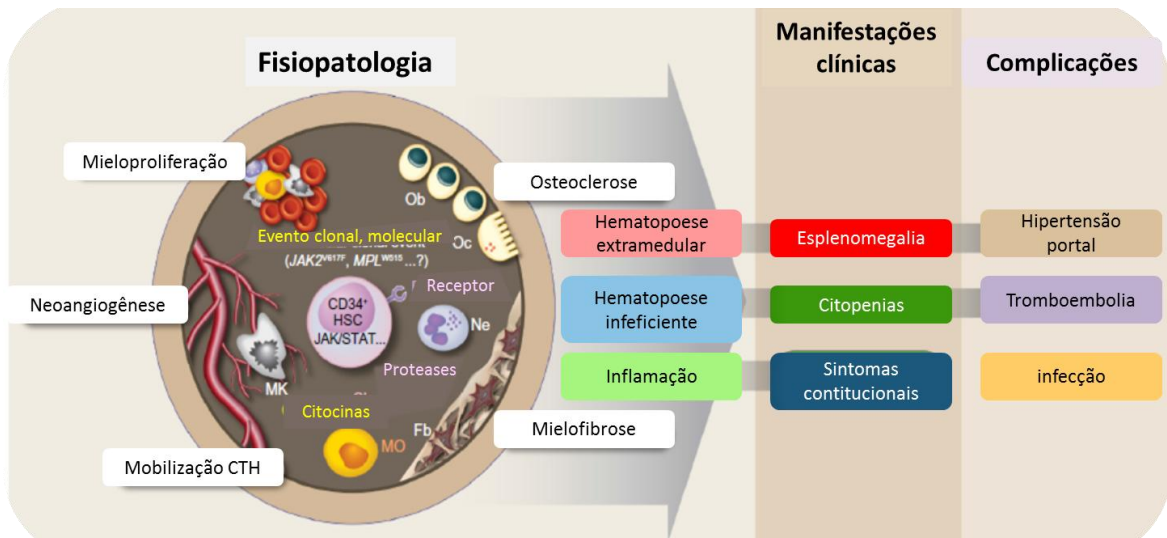


Figura 3. Fisiopatologia, principais manifestações clínicas e complicações comuns de MF

CD34: *cluster* de diferenciação 34; Fb: fibroblasto; HSC: *hematopoietic stem cell*; CTH: célula-tronco hematopoética; JAK: *Janus kinase*; MK: megacariócito; MO: monócito; *MPL*: *myeloproliferative leukemia virus oncogene*; Ne: neutrófilo; Ob: osteoblasto; Oc: osteoclasto; STAT: *signal transducer and activator of transcription*. Adaptado de Mughal *et al.*, 2014

A MF é a menos frequente dentre as NMPs, com incidência mundial estimada de 0,22 a 0,99 casos para cada 100.000 indivíduos, com taxa de incidência anual combinada de 0,47 a cada 100.000. A prevalência variou de 1,76 a 4,05 a cada 100.000 (Titmarsh *et al.*, 2014).

Essa doença acomete principalmente pacientes idosos, sendo a idade média de 67 anos. Cerca de 5 a 17% dos pacientes são diagnosticados antes da idade de 40 a 50 anos, sendo uma condição rara na infância (Mesa *et al.*, 1999).

A etiologia da MF é desconhecida, mas sabe-se que pode advir da progressão de outras doenças hematológicas, como a PV, TE, LMC e Linfoma de Hodgkin, bem como de doenças de origem não hematológicas, como intoxicações, infecções, carcinoma de mama e de próstata (Reilly, 1997; Reeder *et al.*, 2003; Mesa *et al.*, 2007). A progressão para MF ocorre em 25 a 30% nos pacientes com PV e apenas em 2 a 3% dos pacientes com TE (Moulard *et al.*, 2013).

A maioria dos pacientes é assintomática e a doença é detectada geralmente pela descoberta de esplenomegalia e/ou hemogramas anormais durante exames de rotina. Nos pacientes sintomáticos, as manifestações clínicas incluem anemia grave, hepatoesplenomegalia, sintomas constitucionais (fadiga, sudorese noturna, febre),

caquexia, dor óssea, infarto esplênico, prurido, trombose e sangramento. A eritropoese ineficaz e hematopoese extramedular são as principais causas de anemia e organomegalias, respectivamente. Outras complicações da doença incluem a hipertensão portal sintomática, que pode levar ao sangramento de varizes ou ascite, e a hematopoese extramedular não hepatoesplênica, que pode levar a compressão da medula óssea, ascite, derrame pleural, hipertensão pulmonar, ou dor difusa nas extremidades (Tefferi, 2000).

A doença tem duas fases: fase pré-fibrótica, inicial, com medula óssea hiperclular, que evolui até a fase fibrótica, na qual há substituição do tecido hematopoético por fibras reticulínicas e colagênicas.

De acordo com um amplo estudo citogenético realizado em pacientes com MF primária (N=433), foi relatada alteração no cariótipo em 36% (N=158) dos pacientes. Dentre estes, 109 (69%) possuíam uma única anormalidade, 23 (15%) duas anormalidades e 26 (17%) três ou mais anormalidades. A alteração única mais frequente foi a 20q - (28%) (Caramazza *et al.*, 2011). As alterações trissomia 8, i(17q), -5/5q-, 12p-, rearranjo 11q23 ou inversão(3) foram consideradas de prognóstico desfavorável quando ocorreram isoladamente (Vaidya *et al.*, 2011). Recentemente as alterações i(17q) e inv(3) foram associadas ao pior prognóstico (Tefferi, Jimma, *et al.*, 2011). Anormalidades únicas de 13q-, 20q-, +9, e translocações/duplicações no cromossomo 1, foram associados com maior sobrevida dos pacientes (Hussein *et al.*, 2010).

O prognóstico pode variar entre os indivíduos devido a diferenças nas características de agressividade da doença e na idade do paciente ao diagnóstico (Patnaik *et al.*, 2010). A sobrevida está associada à presença de comorbidades e grau de fibrose medular (Lekovic *et al.*, 2014), e as características frequentemente relacionadas à sobrevida são: a idade, o grau de anemia, o número de leucócitos e número de blastos no sangue periférico (Barosi e Hoffman, 2005). A sobrevida dos pacientes com MF é estimada em 5 a 7 anos, podendo chegar a 15 anos em pacientes jovens com bom prognóstico (Cervantes *et al.*, 2009) Entre as principais causas de morte estão sequelas da hipertensão portal, trombose, falência cardíaca, falência hepática, infecções, hipertensão pulmonar, hemorragias causadas por trombocitopenia ou defeitos hemostáticos e transformação leucêmica, que ocorre em 20% dos pacientes (Cervantes *et al.*, 1997; Mesa *et al.*, 2005; Tefferi, 2008).

Ao diagnóstico, a probabilidade de sobrevida pode ser avaliada pelo Sistema de Escore de Prognóstico Internacional (IPSS) (Cervantes *et al.*, 2009), e o Sistema de Escore Prognóstico Internacional Dinâmico (DIPSS-Plus) pode ser usado a qualquer momento durante o curso da doença (Passamonti *et al.*, 2010).

O DIPSS-Plus é um sistema de pontuação que avalia oito fatores de risco independentes (**Tabela 2**), usado para estratificar os pacientes nas categorias de risco baixo (ausência dos fatores de risco), intermediário 1 (presença de um fator de risco), intermediário 2 (presença de 2 ou 3 fatores de risco) ou alto (presença de 4 fatores de risco ou mais). Cada categoria de risco está associada a diferente tempo médio de sobrevida e conduta de tratamento (**Tabela 3**) (Gangat *et al.*, 2011).

Tabela 2. Fatores de risco para mielofibrose primária segundo a classificação DIPSS-Plus

Idade superior a 65 anos

Hemoglobina < 10 g/dL

Leucócitos > 25 × 10⁹/L

Blastos circulantes ≥ 1%

Presença de sintomas constitucionais*

Presença de cariótipo desfavorável**

Plaquetas < 100 × 10⁹/L

Necessidade de transfusão de eritrócitos

*São considerados sintomas constitucionais a presença de febre sem causa determinada, perda de peso maior que 10% em referência ao valor basal e suores excessivos por período maior que 1 mês;

**Considera-se como cariótipo desfavorável, cariótipo complexo ou único ou 2 anormalidades dentre as seguintes: 8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q- 12p-, ou rearranjo 11q23. Adaptado de Tefferi e Vainchenker, 2011

Tabela 3. Categorias de risco segundo a DIPSS-plus para o prognóstico da mielofibrose primária, média de sobrevida e conduta empregada em cada caso

Categorias de risco segundo DIPSS-plus	Média de sobrevida	Conduta empregada
Baixo (sem fatores de risco)	15,4 anos	Observação ou tratamento convencional*
Intermediário 1 (1 fator de risco)	6,5 anos	Observação ou tratamento convencional* ou experimental
Intermediário 2 (2 ou 3 fatores de risco)	2,9 anos	Transplante alogênico de células-tronco ou tratamento experimental
Alto (≥ 4 fatores de risco)	1,3 anos	Transplante alogênico de células-tronco ou tratamento experimental

*Preparações de andrógenos ou talidomida associada à prednisona para anemia; hidroxycarbamida para esplenomegalia. Fonte: Gangat *et al.*, 2011

O diagnóstico da MF é feito de acordo com os critérios da OMS (2016) (Arber, *et al.*, 2016). A presença da mutação $JAK2^{V617F}$ ou MPL^{W515L} podem ser úteis para excluir fibrose da medula óssea reativa. No entanto, a ausência de ambos os marcadores moleculares não exclui a hipótese de NMP. Assim, as causas de fibrose reativa da medula óssea devem ser investigadas nos casos em que nenhum marcador clonal é encontrado. A histologia da medula óssea em combinação com outras características clínicas e laboratoriais ajuda a estabelecer o diagnóstico da MF. Na MF a medula demonstra proliferação megacariocítica marcada com atipia, descrita como a presença de megacariócitos de tamanhos variados com relação núcleo/citoplasma aberrante e hipercromático e núcleos irregularmente dobrados com agrupamento denso, acompanhada por fibrose de reticulina e/ou de colágeno (Arber, *et al.*, 2016)..

Os novos critérios da OMS (2016) classificam a mielofibrose em MF pré-fibrótica e mielofibrose primária. A pesquisa de BCR–ABL1 deve ser realizada para descartar a presença de LMC e os critérios para outras NMPs não devem ser encontrados. Os critérios menores que ajudam a estabelecer o diagnóstico da MF incluem leucocitose, leucoeritroblastose, aumento de desidrogenase láctica (DHL) no soro, anemia e esplenomegalia palpável (**Tabela 4**).

O único tratamento curativo para MF é o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. Alguns autores relataram que a mutação *JAK2*^{V617F} desaparece após o transplante, mas pode recidivar, sendo, portanto um marcador de doença residual mínima capaz de orientar os clínicos quanto ao sucesso do TMO ou quanto à indicação da realização da terapia pós-transplante (Denys *et al.*, 2010; Huijsmans *et al.*, 2011).

Os demais tratamentos para MF são paliativos e a terapia padrão não está bem estabelecida. Os tratamentos utilizados são a hidroxycarbamida, alquilantes orais, agentes imunomoduladores e o interferon-alfa (Mesa, 2009).

Tabela 4. Critérios para o diagnóstico da mielofibrose primária (OMS, 2016)

	Pré-MF	MFP
Critérios maiores	Proliferação megacariocítica e atipia sem fibrose reticulínica > grau 1, acompanhadas pelo aumento da celularidade da MO de ajustada por idade, proliferação granulocítica, e muitas vezes diminuição da eritropoese	Proliferação megacariocítica e atipia acompanhada por fibrose reticulina e/ou colagênica graus 2 ou 3
	Não atender aos critérios da WHO para PV, LMC BCR-ABL1–positivo, síndrome mielodisplásica ou outras disordens mieloides	
	Presença de mutação em <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , ou <i>MPL</i> ou outro marcador clonal*, ou ausência de fibrose reticulínica de menor grau reativa na MO	
Critérios menores	Leucocitose $\geq 11.10^9/L$	Leucocitose $\geq 11.10^9/L$
	Aumento da DHL sérica;	Leucoeritroblastose
	Anemia;	Aumento da DHL sérica
	Esplenomegalia.	Anemia Esplenomegalia

O diagnóstico tanto da Pré-MF quanto da MFP requer a presença dos 3 critérios maiores e pelo menos 1 critério menor. PV: Policitemia Vera; LMC: Leucemia Mieloide Crônica; DHL: Desidrogenase Láctica. * Na ausência de qualquer uma das 3 principais mutações clonais faz a pesquisa das mutações associadas mais frequentes (por exemplo, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1 / IDH2, SRSF2, SF3B1)

Os inibidores de *JAK2* são as maiores promessas na terapia das NMPs, pois os estudos indicam que são capazes de melhorar a qualidade de vida e com

menores efeitos colaterais se comparados aos demais tratamentos. Dentre os inibidores de *JAK2*, o ruxolitinibe (Jakafi[®], Incyte, Wilmington/DE, EUA) foi o primeiro a ser aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), pela *European Medicines Agency* (EMA) e recentemente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso em pacientes com MF de risco intermediário-2 e de alto risco, com o nome comercial Jakavi Novartis[®]. Tal aprovação foi baseada em dois estudos de fase III que confirmaram o valor do ruxolitinibe na redução da esplenomegalia e alívio dos sintomas constitucionais (Harrison *et al.*, 2012; Verstovsek *et al.*, 2012). No ensaio clínico COMFORT-I, 41,9% dos pacientes do grupo tratado com ruxolitinibe atingiram o desfecho primário de redução de pelo menos 35% no volume do baço após 24 semanas de tratamento, contra 0,7% do grupo placebo ($P < 0,001$) (Verstovsek *et al.*, 2012). Em um segundo estudo de fase III, COMFORT-II, 28,5% e 31,8% dos pacientes tratados com este fármaco atingiram o mesmo desfecho primário após 48 e 24 semanas, respectivamente, comparados com 0% dos pacientes recebendo tratamento convencional (Harrison *et al.*, 2012).

Resultados similares foram obtidos em estudos com outros inibidores de JAK. O momelotinibe (Gilead, Foster City/CA, EUA) foi capaz de reduzir o tamanho do baço em pelo menos 50%, em 34% dos pacientes num estudo de fases I/II (Pardanani *et al.*, 2013), e 31% dos pacientes com MF tratados com pacritinibe (CTI Biopharma, Seattle/WA, EUA) apresentaram redução esplênica de pelo menos 35% em um estudo de fase II (Komrokji *et al.*, 2015).

É importante destacar que os estudos demonstram que o ruxolitinibe é capaz de aumentar a sobrevida dos pacientes com MF, desfecho este que nenhum tratamento anterior foi capaz de promover. No estudo COMFORT-I, foi observada maior sobrevida dos pacientes recebendo ruxolitinibe em relação aos que recebiam placebo ao final de quatro meses de tratamento (91,6% vs 84,4%, HR= 0,50, $P=0,04$) (Verstovsek *et al.*, 2012).

2.6 Trombocitemia essencial

A trombocitemia essencial (TE) é uma doença mieloproliferativa clonal advinda de alteração na célula-tronco hematopoética que acomete a linhagem

megacariocítica, tendo como característica a elevação sustentada do número de plaquetas com tendência a trombose e/ou hemorragia (Brière, 2007).

A incidência mundial da TE varia de 0,59 a 2,53 casos/100.000 habitantes e a prevalência é de cerca de 30 casos/100.000 habitantes, semelhantemente à PV (Johansson, 2006). A idade média dos pacientes ao diagnóstico é de 65 a 70 anos, mas pode ser ocasionalmente encontrada em crianças e, em muitos pacientes na terceira ou quarta década de vida. É mais frequente em mulheres que em homens (proporção 2:1). O risco de trombose é maior em pessoas com mais de 60 anos de idade (Fabris e Randi, 2009).

Um terço a um quarto dos pacientes é sintomático ao diagnóstico, e 25% a 48% apresentam esplenomegalia. Sintomas vasomotores, caracterizados por cefaleia, síncope, dor torácica atípica, distúrbios visuais, livedo reticular e queimação de mãos ou pés associada a rubor e calor, são observados em cerca de 40% dos casos (Chauffaille, 2010).

Os sintomas clínicos da TE baseiam-se na predisposição a eventos vasculares oclusivos e hemorrágicos. Os primeiros envolvem a circulação cerebral, coronária e circulação arterial periférica. A trombose nas grandes artérias apresenta a maior causa de mortalidade associada à doença, podendo causar danos neurológicos graves, cardíacos e até mesmo perda das habilidades motoras (Brière, 2007). A maioria dos eventos trombóticos ocorre na forma de trombose venosa profunda e embolia pulmonar. A trombose de veia hepática ou porta (síndrome de Budd-Chiari) ocorre particularmente em pacientes mais jovens (Chauffaille, 2010), apesar do risco de trombose ser maior em pessoas com mais de 60 anos de idade (Fabris e Randi, 2009).

Dor de cabeça e enxaqueca são os sintomas mais comuns, mas podem ocorrer ataques isquêmicos, convulsões e repentinas crises de ausência em decorrência da isquemia. Distúrbios visuais como diplopia e visão turva também podem ocorrer (Brière, 2007).

Os fenômenos hemorrágicos estão presentes em 26% dos pacientes e muitas vezes são limitados às manifestações recorrentes de pele como manchas negras, hematomas subcutâneos, equimoses e epistaxe ou sangramento gengival. Petéquias são raramente vistas. A história de perda de sangue gastrointestinal

(melena e/ou hematêmese) ou a presença de sangue oculto nas fezes pode ser evidenciada no momento do diagnóstico (Brière, 2007).

Anormalidades citogenéticas são incomuns na TE e ocorrem na minoria dos casos (cerca de 5%). As anomalias mais comuns são: trissomias 8 e 9 e deleções em 13q e 20q, que também são observadas na PV e MF (Reilly, 2008).

A trombocitose continua sendo o critério para o diagnóstico da TE. Nos critérios revisados pela OMS (2016), a contagem de plaquetas ao diagnóstico é de $450 \times 10^9/L$ (Arber, *et al.*, 2016). Este nível de trombocitose não é específico para TE, e pode ser associado a processos reativos. Após a exclusão de causas óbvias de trombocitose reativa (deficiência de ferro, trauma, infecção, etc), o teste para a mutação $JAK2^{V617F}$ no sangue periférico é uma ferramenta valiosa. A presença de $JAK2^{V617F}$ confirma a trombocitose clonal, mas uma revisão cuidadosa da extensão de sangue periférico, da biópsia de medula e da citogenética também devem ser realizados para confirmar o diagnóstico de TE. Muitas vezes pode ocorrer trombocitose na LMC, portanto, a presença de BCR-ABL1 deve ser excluída. Além disso, para distinguir a TE de MF em fase pré-fibrótica, a qual caracteriza-se por trombocitose acentuada no sangue periférico, a medula óssea deve apresentar proliferação megacariocítica com aumento do número de megacariócitos maduros, sem desvio à esquerda. A extensão de sangue periférico não deve apresentar leucoeritroblastose. A ausência de $JAK2^{V617F}$ não descarta o diagnóstico de TE dada a grande proporção de pacientes que não apresentam a mutação (Kittur *et al.*, 2007). Apenas 4% dos pacientes com TE, sem mutação $JAK2^{V617F}$, possui mutação no gene *MPL* (Pardanani *et al.*, 2006; Vannucchi *et al.*, 2008; Schnittger *et al.*, 2009) e 30% mutação no gene *CALR* (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013) (**Tabela 5**).

Por décadas atribuiu-se a proliferação megacariocítica aos fatores relacionados à trombopoetina (TPO) e ao seu receptor celular (*c-MPL*), regulados pelas citocinas IL-3, IL-6 e IL-11, que, junto à resistência aos inibidores da plaquetopoese, interagem com o microambiente medular, produzindo e maturando megacariócitos exacerbadamente (Bittencourt *et al.*, 2010).

Na TE, as concentrações séricas de TPO são normais ou ligeiramente aumentadas. Além disso, a expressão dos receptores *c-MPL* está reduzida numa

porcentagem dos pacientes com TE e sua ativação não é constitutiva (Tefferi e Murphy, 2001).

Tabela 5. Critérios para o diagnóstico de trombocitemia essencial (OMS, 2016)

Critérios maiores

Contagem plaquetária $\geq 450 \times 10^9/L$

Biópsia medular demonstrando proliferação preferencial da linhagem megacariocítica com número aumentado de megacariócitos maduros e grandes. Sem aumento ou desvio a esquerda significativo da granulopoese (neutrófilos) ou eritropoese com aumento de fibras reticulínicas raras (grau 1)

Sem critérios para PV, MF, LMC BCR-ABL+ ou SMDs ou outras neoplasias mieloides

Presença de mutação $JAK2^{V617F}$, CALR, MPL

Critérios menores

Presença de marcador clonal sem evidência de trombocitose reativa

O diagnóstico requer a presença dos quatro critérios maiores ou dos três critérios maiores e 1 menor. PV: policitemia vera, MF mielofibrose primária, LMC leucemia mieloide crônica; SMD síndrome mielodisplásica

A hiperplasia megacariocítica acarreta consequente plaquetose, responsável pela redução proteolítica dos multímeros do fator de von Willebrand, promovendo uma síndrome de Von Willebrand adquirida, reforçada pela ativação das plaquetas com defeito no metabolismo do ácido araquidônico e redução dos receptores de prostaglandina D2, mantendo o tromboxano 2 ativo, o que facilita sangramentos (Budde *et al.*, 1984).

Foi demonstrado que a menor carga alélica $JAK2^{V617F}$ é capaz de discriminar pacientes com TE de pacientes com estágio pré-fibrótico da MF (Hussein *et al.*, 2009).

As três mutações somáticas no códon 515 do *MPL* (W515L, W515K, S505N) explica, pelo menos em parte, as alterações nas vias de sinalização das moléculas STAT3, STAT5, na proteína ativadora do mitogênio (MAPK) e na PI3K/AKT,

concedendo ganho de função e vantagem proliferativa aos megacariócitos (Cazzola, 2008; Levine e Heaney, 2008).

A intervenção terapêutica baseia-se na redução de eventos trombóticos sendo utilizada a terapia citorrredutiva, indicada para pacientes de alto risco (hidroxicarbamida, anagrelide ou interferon- α), e de anti-agregação plaquetária (aspirina e clopidogrel) (Brière, 2007).

Diferentemente da MF e da PV, os inibidores de *JAK2* ainda não são indicados para o tratamento de TE (Aruch e Mascarenhas, 2015).

2.7 Policitemia vera

É uma neoplasia clonal caracterizada pelo aumento do volume total da massa eritrocitária independentemente da ação dos mecanismos habituais de regulação da eritropoese (Chauffaille, 2010).

A PV incide preferencialmente em pacientes de 60 a 70 anos e tem incidência anual de 0,7 a 2,5 casos a cada 100.000 habitantes, com média de sobrevida de aproximadamente 15 anos após o diagnóstico. É mais frequente em homens do que em mulheres (Swerdlow *et al.*, 2008).

A PV é uma doença silenciosa e os pacientes podem permanecer assintomáticos por longos períodos. As principais manifestações clínicas incluem cefaleia, pletora, cansaço, tontura e sudorese. O prurido está presente em torno de 40% dos pacientes e é atribuído a aumento de histamina e ao número de mastócitos na pele. Episódios trombóticos (AVC, síndrome de Budd-Chiari, infarto do miocárdio, tromboembolismo pulmonar ou trombose venosa profunda) estão entre as complicações mais comuns, com acometimento de aproximadamente 33% dos pacientes. Sangramentos são descritos em 25% dos casos, mas a trombose costuma ser a causa mais comum de morte.

Os problemas hemorrágicos estão normalmente relacionados com as plaquetas, envolvendo hemorragias espontâneas tipicamente muco-cutâneas, com equimoses, epistaxes e sangramento gengival (Squizzato, Romualdi e Middeldorp, 2008). O risco de hemorragia aumenta com o uso de fármacos antiagregantes plaquetários e, paradoxalmente ao que seria de esperar, ocorre por aumento da

trombocitose, possivelmente devido a uma forma adquirida de doença de von Willebrand. No entanto, a complicação hemorrágica é menos frequente que a trombótica.

A PV pode progredir em 3 fases: (1) Prodrômica ou fase pré-policitémica caracterizada por aumento discreto do número de eritrócitos; (2) Fase policitémica, associada a massa eritrocitária significativamente aumentada; (3) Fase acelerada ou Mielofibrose pós-policitémia na qual as citopenias, incluindo a anemia, estão associadas à hematopoese ineficaz, fibrose da medula óssea, hematopoese extramedular e esplenomegalia (Swerdlow et al., 2008). Na fase tardia da doença, há risco aumentado para evolução da doença para fibrose medular ou transformação em leucemia aguda (Chauffaille, 2010).

A descoberta da mutação adquirida $JAK2^{V617F}$, já citada anteriormente, foi um marco na elucidação desse grupo de doenças (Kralovics et al., 2005). Outras mutações no gene $JAK2$, como no éxon 12, também foram descritas, porém são mais raras (Scott et al., 2007). Na PV a expansão da linhagem eritroide resulta em alta massa eritrocitária, embora na trombocitemia, as altas contagens de neutrófilos e a esplenomegalia estejam presentes em proporção significativa dos casos de PV. A expansão eritroide ocorre independente de eritropoetina (EPO) (Pearson e Messinezy, 1996).

As células progenitoras da medula óssea na PV podem formar colônias eritroides na ausência de EPO *in vitro* (Maran e Prchal, 2004). Estas colônias eritroides endógenas são úteis no diagnóstico diferencial entre PV e policitemias secundárias.

A dissomia uniparental adquirida do cromossomo 9p foi descrita em 2002 em pacientes com PV (Kralovics, Guan e Prchal, 2002), e desde então, o mapeamento desta região demonstrou que essa alteração é bastante comum nas NMPs, o que contribuiu para a descoberta de $JAK2^{V617F}$ posteriormente. Por levar à homozigose de $JAK2^{V617F}$, esta alteração foi associada com pior desfecho clínico da doença (Wang, Wheeler e Prchal, 2015).

Alterações cromossômicas são observadas em cerca de 10% a 30% dos casos, ao diagnóstico, e as mais comuns são: trissomia +8, trissomia +9, del(20q), ganho de material no 1q, del(1q) e del(13q). Com o progredir da doença, a taxa de

anormalidade citogenética atinge algo em torno de 80%, particularmente nos casos em fase fibrótica pós-policitêmica e chega a quase 100% nos casos transformados em leucemia aguda (Chauffaille, 2010).

Segundo a OMS, para o diagnóstico de PV há a necessidade do preenchimento dos três critérios maiores ou dois critérios maiores ou um critério menor (**Tabela 6**).

Casos de provável PV com deficiência de ferro podem oferecer alguma confusão na sua interpretação. A reposição de ferro não é recomendada normalmente, visto que a elevação substancial da hemoglobina oferece risco ao paciente (Levine e Gilliland, 2008).

Para o diagnóstico de fase fibrótica pós-policitêmica são necessários: 1) diagnóstico prévio documentado de PV, segundo critérios da OMS, e 2) fibrose na medula grau 2-3 (na escala de 0-3) ou 3-4 (na escala de 0-4), associados a dois outros critérios que seguem: 1) anemia ou perda sustentada por flebotomia ou uso de medicação citorrredutora para a eritrocitose; 2) quadro periférico de leucoeritroblastose; 3) esplenomegalia progressiva definida tanto por baço palpável a mais de 5 cm do rebordo costal esquerdo ou aparecimento de baço palpável; 4) desenvolvimento de mais de um dos três sintomas constitucionais: perda de mais que 10% do peso nos últimos seis meses; sudorese noturna e febre maior que 37,5°C, sem causa aparente (Chauffaille, 2010).

Tabela 6. Critérios diagnósticos para PV (OMS, 2016)

Critérios maiores

Hemoglobina >16,5g/dL em homens, >16g/dL em mulheres; ou hematócrito > 49% em homens ou > 48% em mulheres; ou aumento da massa eritrocitária;

Medula óssea hiperclular para idade à custa da elevação do número de células das 3 linhagens (panmielose) com megacariócitos pleomórficos;

Presença da mutação *JAK2*^{V617F} ou outra semelhante (éxon 12).

Critérios menores

Dosagem sérica da eritropoetina abaixo do valor de referência normal;

O hemograma apresenta aumento do número de hemácias, hemoglobina e hematócrito; a leucocitose pode estar presente com desvio à esquerda até mielócitos; assim como a basofilia, eosinofilia e monocitose. As plaquetas podem estar aumentadas em número, geralmente entre $500 \times 10^9/L$ e $1.000 \times 10^9/L$ (Chauffaille, 2010).

O mielograma e a biópsia de medula óssea mostram geralmente hiperplasia com hiperplasia de todos os elementos (ainda que a ausência de hiperplasia não exclua o diagnóstico). Observam-se atipias de megacariócitos, com variação de tamanho e predominando elementos grandes com núcleos hiperlobulados. Pode ocorrer discreto aumento de fibras reticulínicas, mas fibrose só ocorre em casos que evoluem para fase pós policitêmica. A coloração Perls não demonstra depósito de hemossiderina na biópsia (Orazi, 2007).

Pacientes com trombose venosa abdominal idiopática devem ser submetidos à pesquisa da mutação em *JAK2*, pois podem progredir para PV. Entretanto, apenas a presença da mutação nesses casos não fecha o diagnóstico de PV, sendo considerada uma doença mieloproliferativa não classificada (Finazzi e Barbui, 2007; McMahon *et al.*, 2007).

Assim como as demais NMPs, para pacientes com PV a única terapia curativa é o transplante alogênico de células tronco, porém apenas uma minoria dos pacientes é elegível para essa terapia (Kundranda, Tibes e Mesa, 2012). As recomendações atuais para pacientes com PV de baixo risco para trombose (idade <60 anos, sem história de trombose ou hemorragia grave) incluem controle rigoroso dos fatores de risco cardiovasculares, uso de aspirina em baixa dose e flebotomia para reduzir o hematócrito abaixo de 45% (Barbui *et al.*, 2011). Os pacientes com maior risco de trombose e complicações relacionadas (idade superior a 60 anos e / ou história de trombose) devem ser considerados para a indicação da terapia citorrredutora que incluem a hidroxycarbamida e o IFN-alfa 2 peguilado, em adição aos tratamentos supracitados (Falchi, Newberry e Verstovsek, 2015).

Para os pacientes que apresentaram falha à terapia com hidroxycarbamida ou interferon, o tratamento de escolha é com agente alquilante como bussulfano, clorambucil ou pipobromano. No entanto, alguns estudos mostram a associação dessas terapias com a progressão da PV para leucemia aguda (Finazzi *et al.*, 2005; Björkholm *et al.*, 2011; Alvarez-Larrán *et al.*, 2014).

Um estudo clínico de fase III com o ruxolitinibe (Jakafi, Incyte) vem sendo feito em pacientes com PV resistentes ou contraindicados para o uso de hidroxycarbamida. Foi mostrado que 38% dos pacientes tratados com ruxolitinibe tiveram redução no baço comparado a 1% dos tratados com a terapia padrão. A normalização do hematócrito foi superior nos pacientes tratados com ruxolitinibe quando comparados aos pacientes tratados com a terapia padrão (60% versus 20%) (Vannucchi, 2015).

Considerando que vários avanços vem sendo feitos na identificação de novas mutações em pacientes com NMPs desde 2005, bem como, no estudo das vias de sinalização, ainda há questões a serem elucidadas no que se refere à fisiopatologia desse grupo de doenças. Os mecanismos envolvidos na patogênese e progressão dessas NMPs não estão completamente elucidados. Sabe-se que a angiogênese possui papel importante no processo tumorigênico e é complexamente regulada por várias proteínas tais como as metaloproteinases de matriz (MMPs), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), entre outras. Nesse contexto, o presente trabalho contribuirá com a descrição da potencial relação entre nicho medular, angiogênese e fisiopatologia das NMP.

Nos tópicos a seguir, serão apresentadas as metaloproteinases e as proteínas relacionadas, bem como as suas relações com a angiogênese e neoplasias hematológicas.

2.8 Metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases de matriz (MMPs) foram identificadas em 1962 em um estudo que descreveu sua atividade enzimática na degradação da tripla hélice do colágeno durante o processo de metamorfose da cauda do girino (Gross e Lapiere, 1962). Essa enzima foi denominada colagenase intersticial ou MMP-1, sendo posteriormente estudada e sugerido seu papel na clivagem de diversos componentes da matriz extracelular (MEC) (Teronen *et al.*, 1995).

As MMPs são endopeptidases zinco-dependentes que desempenham importante função em vários processos biológicos. De acordo com a sua especificidade ao substrato, as MMPs podem ser classificadas em cinco grandes

grupos: colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10 and MMP-11), matrilisinas (MMP-7, MMP-26) e MMPs de membrana (MT-MMPs) (Chaudhary *et al.*, 2013).

Essas proteases compartilham a mesma topologia estrutural, com pré e pós-domínios, seguidos de um domínio catalítico. O pré-domínio NH₂-terminal é uma pequena porção hidrofóbica que direciona a síntese dessas proteases para o retículo endoplasmático e a secreção para o espaço extracelular. O pró-domínio localizado após o pré-domínio, com aproximadamente 80 aminoácidos, contém um resíduo conservado de cisteína que interage com o íon zinco (Zn²⁺) no sítio ativo do domínio catalítico e impede a ligação e clivagem do substrato, mantendo a enzima em sua forma inativa. No domínio catalítico, o Zn²⁺ está ligado ao sítio ativo por três resíduos conservados de histidinas e também está ligado ao C-terminal por uma articulação flexível (região da dobradiça), que possui uma estrutura variável (**Figura 4A**). O domínio hemopexina é composto por 4 hélices beta, o que resulta numa estrutura plana; esse domínio está ausente em MMP7 e MMP26. As MMP2 e 9 possuem em suas estruturas três repetições de fibronectina do tipo II inserido no domínio catalítico, aumentando sua especificidade ao substrato (**Figura 4B**). As MMPs tipo membrana (MT-MMPs) possuem em sua estrutura um domínio hidrofóbico transmembrana do tipo I, seguido de uma cauda citosólica, que interage com proteínas intracelulares, e, ainda, possuem uma conformação diferente do sítio catalítico (“MT-loop”), (**Figura 4B**) (Chaudhary *et al.*, 2013).

As MMPs degradam seletivamente vários componentes da matriz extracelular (MEC), resultando na liberação/ativação de vários fatores de crescimento latentes, citocinas e quimiocinas, e na clivagem de proteínas de superfície celular (receptores de citocinas, moléculas de adesão, o receptor de uroquinase) (Bauvois, 2012).

As MMPs são expressas no estado inativo devido à interação do resíduo de cisteína do pró-domínio com íons zinco do sítio catalítico, e ativam-se por meio da quebra desta interação, num mecanismo denominado “switch” de cisteína, no qual ocorre a remoção proteolítica do pró-domínio ou modificação química do resíduo de cisteína. O pró-domínio contém uma sequência consenso que requer a clivagem proteolítica por convertases, tais como a furina, outras MMPs ativas ou serinoproteases (Sternlicht e Werb, 2001).

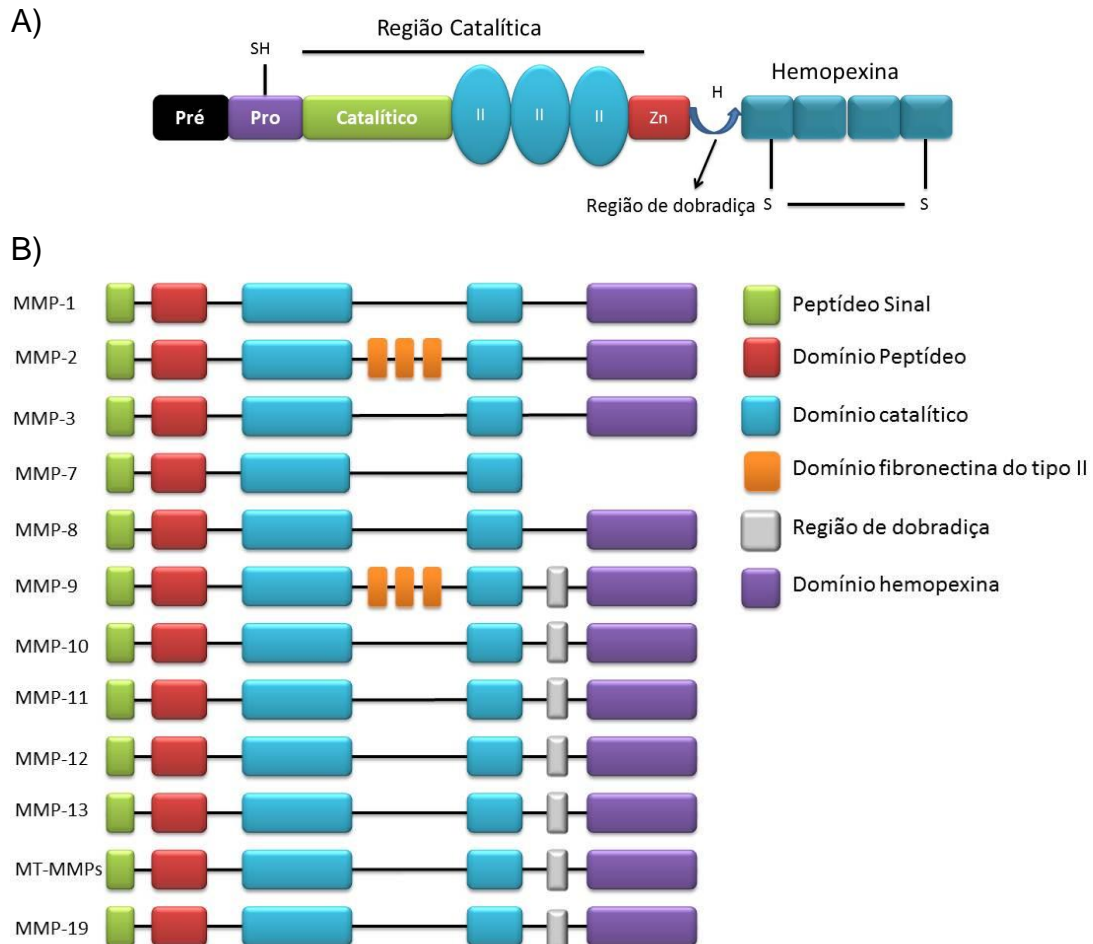


Figura 4. Estrutura das MMPs. (A) Domínios estruturais das MMPs. (B) Representação esquemática das MMPs com seus diferentes domínios estruturais Adaptado de Chaudhary *et al.*, 2013

A função das MMPs *in vivo* depende do equilíbrio local entre estas e seus inibidores fisiológicos. Uma fonte substancial de energia é destinada para a prevenção da proteólise extracelular desregulada, seja pelas MMPs ou por outras proteinases (Kessenbrock, Plaks e Werb, 2010).

Os inibidores fisiológicos mais importantes das MMPs são os inibidores teciduais de metaloproteinases ou *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). Os TIMP1, 2, 3 e 4 formam complexos com as MMPs ativas, levando à inibição da atividade proteolítica (Yan e Boyd, 2007).

A expressão aumentada dessas proteases em tecidos tumorais apresenta grande relevância fisiopatológica, pois estão envolvidas com processos de invasão e metástase. Entretanto, é necessário levar em consideração a presença ou ausência

dos inibidores endógenos ou ativadores das enzimas no microambiente avaliado (Kessenbrock, Plaks e Werb, 2010) (Sbardella *et al.*, 2012).

As gelatinases são foco de maior atenção na relação das MMPs com o câncer, pois estão superexpressas em diversos tipos de tumores malignos e associadas à agressividade do tumor e ao pior prognóstico (Bauvois, 2012). A expressão desregulada de MMPs foi descrita em neoplasias hematológicas, como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia de células T, leucemia linfocítica crônica B (LLC-B), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), síndromes mielodisplásicas (SMD), linfoma de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin (Klein *et al.*, 2004; Yu e Han, 2006).

Em relação às neoplasias hematológicas, foi demonstrado que altas concentrações séricas de MMP9 podem prever o pior desfecho clínico de pacientes com LLC, o que pode auxiliar na determinação do prognóstico da doença e indicar a necessidade de tratamentos mais agressivos (Buggins *et al.*, 2011). A expressão aumentada de MMP2 e MMP9 foi encontrada em pacientes com SMD e LMA, em contraste com amostras de indivíduos saudáveis, nas quais foi detectada a expressão de MMP2 em raras células mieloides. Sugere-se que a produção e liberação dessas enzimas influenciariam o comportamento das células hematopoéticas (Travaglio *et al.*, 2008).

A expressão aumentada de MMP2 e 9 foi também relatada no curso clínico da LLA, e evidenciou-se diferença na expressão de MMP2 e 9 entre os casos de LLA em adultos e crianças. Foi observada correlação positiva entre a expressão de MMP2 e o aparecimento de infiltrados extramedulares em adultos com LLA (Kuittinen *et al.*, 2001). Outro estudo realizado em pacientes com LLA mostrou correlação positiva entre hepatoesplenomegalia e as razões de expressão de RNAm de *MMP2/TIMP1* e *MMP2/TIMP2*. Estes resultados sugerem que o equilíbrio da expressão MMP/TIMP está estreitamente relacionado com a infiltração de células leucêmicas em órgãos extramedulares (Suminoe *et al.*, 2007).

As MMPs têm contribuição importante na regulação da angiogênese, pois medeiam a degradação da membrana basal endotelial e proteínas da matriz extracelular, liberando fatores angiogênicos como, por exemplo, VEGF (Roy, Zhang e Moses, 2006). Além do VEGF, a biodisponibilidade de outros fatores angiogênicos relevantes é regulada pela atividade de MMP. O bFGF pode ser ativado por MMP2,

pela clivagem do ectodomínio do receptor FGF-1, liberando domínio extracelular solúvel, que retém a capacidade de ligação ao FGF, regulando negativamente sua atividade (Roy, Zhang e Moses, 2006). Além disso, as MMP2 e 9 ativam diretamente TGF- β 1 (Yu e Stamenkovic, 2000) e têm sido associadas à neovascularização tumoral e normal (Tremblay *et al.*, 2011; Christoffersson *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

2.9 Proteína ácida secretada e rica em cisteína (SPARC)

Outra proteína capaz de regular a angiogênese é a *secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC), conhecida como osteonectina. Não há consenso na literatura sobre as funções da SPARC em tumores, pois ora é descrita como anti-proliferativa, ora como pró-tumorigênica (Clark e Sage, 2008).

A SPARC é capaz de se ligar diretamente a VEGF, inibindo a proliferação microvascular de células endoteliais estimulada por VEGF165, indicando sua atividade anti-angiogênica. Tal ligação impede a autofosforilação de VEGF1, ativação da via ERK1/2 e síntese de DNA induzida por VEGF (Chlenski *et al.*, 2006; Chandrasekaran *et al.*, 2007). Além disso, SPARC pode inibir a angiogênese indiretamente por meio da regulação da expressão de outros genes relacionados com a angiogênese, tais como as MMPs (Shankavaram *et al.*, 1997) e TGF- β 1 (Francki *et al.*, 1999). De fato, foi verificado recentemente, *in vitro* e *in vivo*, que a expressão de SPARC inibe a angiogênese mediada por VEGF devido à diminuição da expressão de MMP9 (Bhoopathi *et al.*, 2010). Outro estudo mostrou que a superexpressão da SPARC conduz a diminuição da densidade microvascular, resultando na redução da formação e do tamanho do tumor em xenoinxertos de carcinoma hepatocelular (Lau *et al.*, 2006). Da mesma forma, SPARC acentua as funções de inibição da neoangiogênese via TGF- β 1 em células epiteliais, pela estimulação da fosforilação dos Smad2 e 3 (Schiemann, Neil e Schiemann, 2003).

Em contraste, outros autores associaram a SPARC à atividade pró-angiogênica em adenocarcinoma pancreático (Chlenski e Cohn, 2010), pois esta ativa TGF- β 1 em camundongos SPARC *knockout* (Arnold *et al.*, 2012). Ainda nesse contexto, outro estudo demonstrou que a SPARC desempenha um papel importante no aumento da expressão de MMP2 e MMP9, promoção da angiogênese e invasão de células de glioma *in vitro*, devido ao aumento da atividade de uPA/uPAR, que

ativa a via PI3K e RhoA (Kunigal *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013). De fato, foi demonstrado que a expressão de SPARC está correlacionada diretamente com a expressão das MMPs -2 e -9 (Li *et al.*, 2013).

Em NMPs, a deleção SPARC 5q31.3-32 foi associada à SMD com deleção 5q, (Lehmann *et al.*, 2007), e a expressão baixa ou ausente de SPARC foi reportada em um subgrupo de LMA com rearranjos no gene *MLL* (Dimartino *et al.*, 2006). Em pacientes com LMC, foi relatado que a baixa expressão de SPARC é comum de células *BCR-ABL1* positivas, e que esse quadro pode ser revertido pelo tratamento com mesilato de imatinibe (Giallongo *et al.*, 2013). De modo oposto, a superexpressão de SPARC foi descrita como mecanismo de resistência ao mesilato de imatinibe em células *BCR-ABL1* positivas, o que sugere relação dos níveis dessa proteína com a progressão do clone mieloide e resistência aos inibidores de tirosinoquinase (Fenouille *et al.*, 2010).

A proteína SPARC mostrou ser fundamental ainda na manutenção da fibrose anormal, que ocorre em doenças mieloides malignas. Foi verificado, em modelo celular de mielofibrose induzida por TPO, que a superexpressão dessa proteína contribuiu para o desenvolvimento da fibrose revelando a influência de SPARC na resposta da medula óssea hematopoética em condições mieloproliferativas anormais (Tripodo *et al.*, 2012).

2.10 Fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1)

As células tumorais podem sobreviver sob condições de hipóxia, adaptando-se à baixas tensões de oxigênio ou aumentando a vascularização. O principal regulador utilizado pelas células tumorais para se adaptar à hipóxia é o fator de transcrição HIF-1 (*hipoxia-inducible factor-1*) (Semenza, 2010). A adaptação das células tumorais à hipóxia é conhecida como efeito de Warburg (Warburg, 1924; Warburg, 1928).

O HIF, um fator de transcrição heterodimérico, é composto por duas subunidades, a HIF- α , regulada pelos níveis de oxigênio e de modificações pós-traducionais sensíveis aos níveis de oxigênio; e a HIF- β , expressa constitutivamente no núcleo (Semenza, 2009).

A subunidade α é altamente regulada e tem três homólogos que se ligam ao mesmo HIF- β , ou seja, o HIF-1, HIF-2 e HIF-3. A regulação da expressão gênica dependente de HIF exige o acúmulo de HIF- α no citoplasma, a translocação para o núcleo, onde se dimeriza com o HIF- β e se liga a co-ativadores HIF, antes da ligação dos elementos de resposta a hipóxia (ERH) aos genes-alvo para iniciar a transcrição. Os principais reguladores de modificações pós-traducionais de HIF- α são oxigenases reguladas pela tensão de oxigênio, níveis de 2-oxoglutarato, íon ferro no estado ferroso (Fe^{+2}) e ácido ascórbico. Tais enzimas contêm um domínio de prolil hidroxilase (PHDs) e inibidor de HIF-1 α e HIF-2 α , ou seja, o HIF-3, também conhecido como FIH1. As PHDs hidroxilam resíduos de prolina dentro de HIF- α , tornando, assim, o HIF- α reconhecível para o supressor de tumor de von Hippel Lindau (VHL), o que leva a sua degradação e poliubiquitinação proteossomal (Maxwell *et al.*, 1999) (**Figura 5**). O FIH1 é uma asparaginil β -hidroxilase que regula a função de HIF por hidroxilação dos resíduos de asparagina, impedindo a interação de HIF com sua co-ativadora p300 (Ema *et al.*, 1999). Assim, em condições nas quais o fornecimento de O_2 é limitado, as subunidades HIF- α se acumulam e ativam a transcrição de genes que contêm HRE.

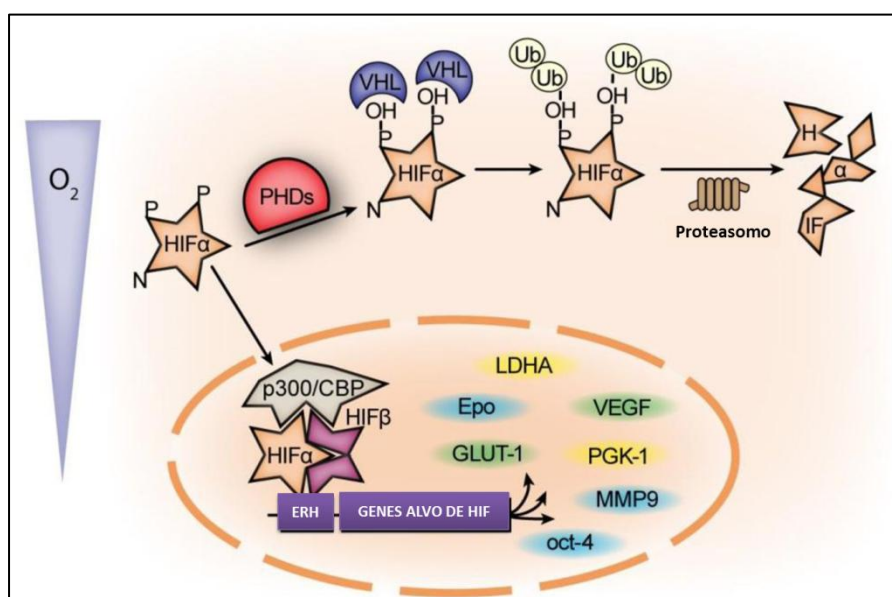


Figura 5. Regulação dependente de oxigênio de HIF- α e seus genes alvo

Se a demanda de oxigênio é suprida, HIF- α torna-se constantemente hidroxilado por hidroxilases e, posteriormente, sofre degradação proteossômica após a ligação a VHL. Sob condições hipóxicas, HIF- α é estabilizada, se transloca para o núcleo onde se liga ao HIF- β , bem como para outros co-fatores, e conduz à activação da transcrição de genes alvo que contêm sequências de ERH na sua região promotora. Adaptado de Franke, Gassmann e Wielockx, 2013

O HIF-1 se liga a ERH de genes alvo, tais como *VEGF*, eritropoietina (*EPO*), e as metaloproteinases de matriz (*MMP*), ativando-os (Maxwell e Salnikow, 2004; Salnikow *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2011).

Foi descrito em algumas linhagens de células tumorais que as *MMPs* podem ser ativadas por HIF-1 (Osinsky *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2011; Vinothini *et al.*, 2011) e que a sinalização HIF-1/MT1-MMP pode estimular a migração oncogênica de células estromais mesenquimais (MSCs) em condições de hipóxia (Proulx-Bonneau, Guezguez e Annabi, 2011). A alta expressão de HIF-1 foi associada à superexpressão de MMP-9 em células de câncer de mama em condições de hipóxia (Choi *et al.*, 2011). Além disso, elevadas concentrações de HIF-1 aumentaram a expressão de MMP-2 e MMP-9 em monócitos humanos (Wan *et al.*, 2011) e a alta atividade destas *MMPs* foi correlacionada aos níveis de hipóxia e metástase em tumor sólido (Osinsky *et al.*, 2005).

A relação entre HIF1 e *MMPs* ainda não foi descrita nas NMPs. A determinação da interação entre a atividade das *MMPs*, hipóxia e expressão de HIF1 pode ser útil para esclarecer o papel das proteínas reguladas pela hipóxia nas NMPs e podendo ser um marcador prognóstico útil de evolução da doença, devido ao envolvimento em processos críticos na progressão mais agressiva para mielofibrose.

Considerando que os fatores de crescimento, tais como bFGF e VEGF, são importantes para a progressão do tumor e angiogênese, especula-se que a interação com as *MMPs*, seus inibidores (TIMPs), HIF1- α e SPARC podem influenciar a fisiopatologia e a progressão das NMPs (**Figura 6**). O presente trabalho teve como objetivo contribuir neste aspecto, uma vez que, até o momento, não foi avaliada a relação da expressão gênica das *MMPs*, TIMPs, HIF1- α e SPARC com a expressão dos biomarcadores de angiogênese bFGF e VEGF em pacientes com MF e TE *JAK2*^{V617F} positivos e negativos; bem como estudos utilizando modelos animais nocautes para *HIF* e *VHL*.

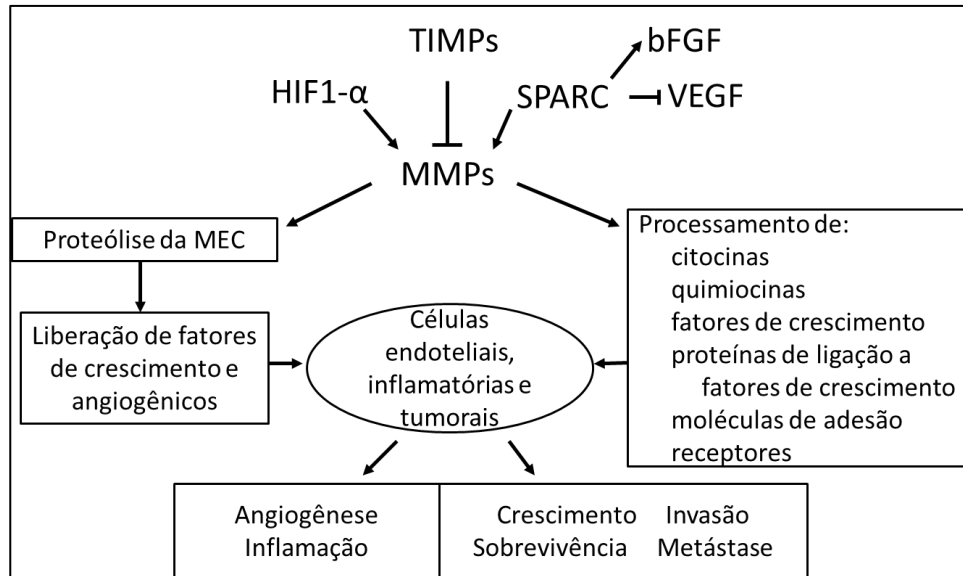


Figura 6. Interação das MMPs, HIF1- α , TIMPs e SPARC com os fatores angiogênicos VEGF e bFGF

Os símbolos \rightarrow e $--|$ representam ativação e inibição, respectivamente. Adaptado de Bauvois, 2012

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação da expressão gênica das MMPs, TIMPs, HIF1- α e SPARC com a expressão dos marcadores de angiogênese bFGF e VEGF em pacientes com MF e TE, considerando o *status* mutacional; bem como, avaliar a regulação desses genes em modelos animais nocautes para *HIF1- α* e *VHL*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de expressão diferencial de *MMP2* e *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* e *HIF1- α* em leucócitos totais do sangue periférico entre pacientes com NMPs e controles pareados segundo idade e gênero;
- Comparar as concentrações séricas de *MMP2*, *MMP9*, *SPARC*, *TIMP1* e *TIMP2* em leucócitos totais do sangue periférico entre pacientes com NMPs e controles;
- Verificar se a expressão gênica de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *HIF1- α* , em leucócitos totais do sangue periférico de pacientes com MFP, está associada à classificação de risco DIPSS-plus;
- Determinar se existe associação entre as concentrações séricas de *MMP2*, *MMP9*, *SPARC*, *TIMP1* e *TIMP2* e os marcadores plasmáticos de angiogênese (VEGFA e bFGF) nos pacientes com NMPs e controles;
- Avaliar se a expressão de RNAm de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, do sangue periférico de pacientes com MF e TE está associada à intensidade de angiogênese;
- Verificar se a expressão de RNAm de MMPs e TIMPs em colônias BFU-E de pacientes com NMPs é dependente da tensão de oxigênio (hipóxia e normóxia);
- Quantificar a expressão de RNAm de MMPs e TIMPs em modelos animais: 1- em embriões de camundongos C57BL/62 nocaute (*HIF1- α ^(-/-)*) e selvagens, 2- em fígados de camundongos Chuvash (*VHL^(-/-)*) e selvagens para esta mutação, e 3- em medula óssea de camundongos C57BL/62 selvagens expostos à hipóxia e normóxia.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Pacientes com MF e TE

Foram estudados 71 pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMPs), sendo 21 com MFP, 21 com mielofibrose pós-TE (MFPTE), 6 com mielofibrose pós-PV (MFPPV) e 23 com TE, de ambos os gêneros e com idades entre 27 e 93 anos, atendidos no Departamento de Hematologia e Oncologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, sob supervisão da Profa. Dra. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille. Os casos foram selecionados baseados no diagnóstico segundo a OMS de 2016 (Arber, *et al.*, 2016). Foram excluídos os pacientes portadores de outras neoplasias, de doenças infecciosas, doenças inflamatórias, auto-imunes, fúngicas, bacterianas ou virais. Tais informações foram obtidas por meio de entrevista e avaliação do prontuário dos pacientes.

Os aspirados e biópsias de medula óssea foram coletados em caso de necessidade diagnóstica ou para acompanhamento do tratamento, de acordo com a indicação médica. Desse modo, foram coletadas as biópsias da medula óssea de 26 pacientes, sendo 8 com MFP, 8 com MFPTE e 10 com TE. Foram obtidos os aspirados medulares de 6 desses pacientes, sendo dois com MFPTE e quatro com TE.

4.1.2 Controles

O grupo controle foi constituído de 79 indivíduos saudáveis, sendo que 32 desses foram pareados conforme gênero e idade com os pacientes com MFP, 46 com os pacientes com TE, 21 com os pacientes com MFPTE e 14 com os pacientes MFPPV. Dois dos controles foram excluídos, devido a alterações encontradas nos hemogramas.

Os indivíduos desse grupo são funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP) e da UNIFESP, além de indivíduos de instituições específicas da cidade de São Paulo, tais como a “Casa Cristã do Idoso – Núcleo de Convivência para Idosos” (Bairro Butantã), “Associação Idade Dourada” (Bairro Pinheiros) e “Paróquia São Mateus” (Bairro Rio Pequeno).

Foram analisados o hemograma e a determinação de proteína C reativa ultrasensível (PCRus) de cada indivíduo para confirmar seu bom estado hematológico e bioquímico. Foram excluídos indivíduos que declararam ter apresentado febre, infecções, inflamações e alergias no último mês, condições essas que podem alterar o perfil das citocinas, e indivíduos que faziam uso de medicação, exceto para o tratamento de hipertensão arterial e/ou diabetes e indivíduos com histórico de neoplasias.

4.1.3 Aspectos Éticos

Os pacientes com MF e TE e os controles incluídos no estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal de São Paulo em 27 de agosto de 2012, sob o número do parecer 88.940.

4.2 Amostras biológicas

Foram coletados, dos pacientes e controles, 8 mL de sangue periférico em tubos a vácuo Paxgene™ (*PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH*) para a extração de RNA, 8 mL em tubo contendo EDTA (sistema Vacutainer®) para extração de DNA e plasma, e mais 6 mL de sangue periférico em tubos sem anticoagulante (sistema Vacutainer®) para obtenção de soro.

As amostras de medula óssea foram coletadas pelo médico responsável no momento da coleta dos exames de diagnóstico ou de acompanhamento do tratamento do paciente com MF ou TE. Do volume de medula colhido, cerca de 2 a 3 mL foram utilizados neste estudo. A medula óssea foi coletada em seringa heparinizada e transferida para tubos a vácuo (sistema Vacutainer®) contendo EDTA (anticoagulante) para a extração do DNA e RNA. A biópsia da medula óssea e a história clínica de cada um dos pacientes foram adquiridas pelo médico responsável.

As amostras biológicas de sangue periférico dos participantes deste estudo foram codificadas e armazenadas a -80°C em biorrepositório sob a responsabilidade

da Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, do Laboratório de Hematologia da FCF-USP.

4.3 Métodos

Exames laboratoriais realizados em todos os participantes do estudo (pacientes com MF e TE e controles)

4.3.1 Determinação do hemograma e Proteína C Reativa ultrasensível (PCRus)

Os dados hematológicos foram obtidos por meio do contador eletrônico Pentra 120[®] (*HORIBA*, Montpellier, França). As determinações de PCRus foram realizadas em amostras de soro por imunoturbidimetria ultrasensível utilizando o kit Roche-CRPL 3 e o equipamento COBAS 8.000[®] (*Roche Diagnostics*, Indianapolis, EUA).

4.3.2 Dosagem das concentrações plasmáticas de VEGFA e bFGF

As concentrações de FGF2/bFGF e VEGFA foram determinadas utilizando-se o kit x-MAP Luminex (#HAGPIMAG-12K-02, lote: 2216745). Para essas determinações foram utilizadas amostras de plasma estocadas a -80°C até o momento da análise.

4.3.3 Dosagem das concentrações séricas de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC

As concentrações de MMP2, MMP9 (HMMP2MAG-55K-02, lotes 2396018), TIMP1, TIMP2 (HTMP1MAG-54-02 lotes: 2326405) e SPARC (código HCMBMAG-22K lotes 2326392) foram determinadas utilizando-se o kit x-MAP Luminex. Para essas determinações foram utilizadas amostras de soro estocadas a -80°C até o momento da análise.

A determinação da concentração de SPARC, nas amostras de pacientes e controles, foi feita em dois momentos devido a falta de recursos para a compra dos 2 kits simultaneamente. A primeira metade das amostras dos pacientes e dos controles incluídos no estudo (11 MFP, 14 MFPTE, 2 MFPPV e 36 controles) foi

dosada em outubro de 2013. Solicitamos a compra do segundo kit para o Instituto Genese de Análises Científicas (IgAc); no entanto, a empresa demorou quase um ano para entregar o referido kit, levando ao atraso do estudo em questão. É importante salientar que as amostras de soro foram armazenadas no IgAc até a chegada do segundo kit em dezembro de 2014.

Ao comparar os resultados enviados do segundo lote, observou-se enorme discrepância nos valores dos resultados quando comparados ao primeiro lote. Desse modo, na presente tese serão apresentados os resultados apenas do primeiro lote.

4.3.4 Extração e avaliação da qualidade de RNA total da medula óssea e do sangue periférico e síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total do sangue periférico foi obtido empregando-se os kits PAXGENE Blood miRNA kit e PAXGENE Blood RNA kit (*PreAnalytix/ Qiagen*, Alemanha), enquanto o RNA da medula óssea foi extraído empregando-se o kit PAXGENE Bone Marrow RNA kit (*PreAnalytix/ Qiagen*, Alemanha), conforme protocolos do fabricante. A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria, e a pureza foi determinada pela relação $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ empregando-se o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA). O RNA foi aceito como puro quando a relação $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ foi de aproximadamente 2,0. Em seguida, as amostras de RNA total foram armazenadas a -80°C até o momento da síntese do DNA complementar (cDNA).

A síntese do cDNA foi realizada por reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O ensaio foi realizado utilizando-se o kit *SuperScriptVilo™ Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City/CA, EUA), a partir de 500 ng de RNA total. As reações foram realizadas em termociclador *Mastercycler Gradient* modelo 22331 (*Eppendorf*, Hamburg, Alemanha), com as seguintes etapas: 10 minutos a 25°C , 60 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C . O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização dos ensaios da expressão de RNAm.

4.3.5 Escolha do gene de referência

A análise da expressão de RNAm foi feita pelo método de quantificação relativa, usando genes de referência como controles endógenos. Para a escolha

destes genes utilizou-se o programa qbasePLUS, versão 2.4 (*Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica*), baseado no geNormTM (Vandesompele *et al.*, 2002). Este teste foi feito empregando-se RNA de pacientes 6 pacientes de cada grupo: MF, TE e indivíduos controle.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *ABI 7500 Fast* (*Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA*), utilizando os ensaios *TaqMan[®] Gene Expression Assays* (*Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA*) descritos na **Tabela 7**. A amplificação foi avaliada por monitoração contínua de fluorescência, conforme previamente descrito (Hirayama *et al.*, 2008).

Tabela 7. Características dos ensaios *TaqMan[®]* utilizados para avaliação da expressão dos genes candidatos pela técnica de PCR em tempo real

Gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>ACTB</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs01060665_g1	63
<i>B2M</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs00984230_m1	81
<i>GAPDH</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs00266705_g1	74
<i>HMBS</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs00609293_g1	62
<i>HPRT1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs02800695_m1	82
<i>UBC</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs02800695_m1	135

ACTB: beta-actina; *B2M*: beta-2-microglobulina; *GAPDH*: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; *HMBS*: hidroximetilbilano sintase; *HPRT1*: hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *UBC*: ubiquitina C; pb: pares de bases

A expressão relativa de cada um dos genes foi calculada e, os dados foram inseridos no programa *GeNormTM* (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), que gera uma planilha mostrando os genes mais e menos instáveis. Segundo o programa, o gene considerado com menor estabilidade de expressão (M) para as amostras foi o *HMBS* (M=1,707), com estabilidade intermediária foram os genes *UBC* (M=1,084), *BM2* (M=0,812) e *HPRT1* (M=0,684) e os genes com maior estabilidade foram *GAPDH* (M=0,668) e *ACTB* (M=0,624). Tais coeficientes foram considerados adequados para a condução dos experimentos, pois estão dentro do valor de estabilidade de expressão aceitável para matrizes complexas (M≤1), como o sangue, de acordo com Hellemans e colaboradores (2007) (Hellemans *et al.*, 2007).

Deste modo, selecionamos os genes *ACTB* e *GAPDH* para serem utilizados como genes de referência.

4.3.6 Quantificação e análise da expressão de RNAm dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* e *HIF1- α* por PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real para RNAm foram realizados em duplicata, utilizando os ensaios *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* (*Applied Biosystems*, USA), com o equipamento *ABI 7500 Fast* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA). Os ensaios utilizados estão descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Características dos ensaios *TaqMan*[®] utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real

Gene	Identidade do ensaio da	Tamanho do fragmento
	Applied Biosystems	amplificado (pb)
<i>MMP2</i>	Hs01548727_m1	65
<i>MMP9</i>	Hs00234579_m1	54
<i>TIMP1</i>	Hs00171558_m1	104
<i>TIMP2</i>	Hs00234278_m1	73
<i>SPARC</i>	Hs00234160_m1	76
<i>HIF1-α</i>	Hs00153153_m1	76

pb: pares de bases

Como controle de qualidade, para cada placa de reação foram realizados controles sem amostra (controle negativo) para avaliar possíveis contaminações dos reagentes com os produtos de PCR.

Os resultados foram analisados utilizando-se o software *System 7500* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA), que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. Para a quantificação relativa da expressão de RNAm, foi utilizado o método comparativo com ciclo de *threshold* (CT) (Livak e Schmittgen, 2001). A fórmula utilizada foi $2^{-\Delta C_T}$, onde ΔC_T é igual ao C_T do gene de interesse menos o C_T do gene de referência.

Exames realizados apenas nos pacientes com MF e TE

4.3.7 Mielograma e/ou biópsia da medula óssea

O mielograma e a biópsia de medula óssea foram obtidos pelo médico responsável pelo paciente na UNIFESP. Esses exames foram feitos em caráter assistencial pelas unidades colaboradoras desse projeto e foram realizados na UNIFESP, sob os cuidados da Dra. Maria Regina Régis Silva.

Os tecidos de biópsia da medula óssea foram fixados em formalina tamponada 10%, processados de acordo com técnicas de histologia convencionais e embebidos em parafina. Cortes de 2 μ m de espessura foram submetidos aos seguintes protocolos de coloração: Hematoxilina-eosina (HE), Giemsa (GM) e impregnação com a prata de Gomori (reticulina). As lâminas histológicas foram analisadas independentemente por dois patologistas e casos discordantes foram revistos em conjunto.

4.3.8 Análise citogenética para pesquisa de alterações cromossômicas

Esta análise foi realizada como rotina no Departamento de Hematologia e Oncologia da UNIFESP. Parte da medula colhida foi colocada em tubo heparinizado e a análise citogenética de banda G foi feita a partir do método descrito por Mitelman e colaboradores (1997). Para cada amostra, 20 metáfases foram estudadas de acordo com as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN, 2009).

4.3.9 Análises imunohistoquímicas

Essas análises foram realizadas pela Dra. Maria Regina Régis Silva e pelo Dr. César Cilento Ponce nas biópsias de medula óssea de 26 pacientes. Todas as lâminas foram avaliadas independentemente pelos dois pesquisadores, e casos discordantes foram revistos em conjunto.

4.3.9.1 *Preparo das amostras*

Para todas as análises imunohistoquímicas realizadas, as biópsias de medula foram cortadas com dois micrômetros, recolhidas em lâmina polarizada. Os cortes foram processados usando-se xileno e álcool quentes (por 20 minutos) e frios (por 20 minutos) para desparafinização. Foram realizados cinco bloqueios de atividade da peroxidase endógena.

4.3.9.2 *Angiogênese estimada – grau de microvasculatura*

A quantificação da densidade microvascular foi realizada com o uso de IgG (imunoglobulina)1 kappa monoclonal de camundongo anti-CD34 Classe II humano (Dako-M7165 - QBEnd 10) em seções de medula óssea, conforme previamente descrito (Ponce *et al.*, 2012; Ponce *et al.*, 2014), com diluição de 1:100.

A angiogênese foi avaliada em cada amostra usando graduação visual da microvasculatura. As lâminas foram visualizadas e escaneadas em aumento de 100x, 200x, e 400x e graduadas semiquantitativamente pela coloração com CD34, usando-se microscópio de luz. A escala semiquantitativa empregada foi: microvasos grau 1 (vasos escassos), grau 2 (ligeiro aumento difuso nos vasos), grau 3 (áreas com aumento acentuado no número de vasos), e grau 4 (aumento extensivo do número de vasos). As contagens atribuídas para os resultados de imunexpressão avaliados foram comparados entre os grupos de pacientes.

4.3.10 *Extração e avaliação do DNA genômico*

Para otimizar o processo de extração do DNA, no sentido de obter maior concentração de DNA, 1 mL das amostras de sangue foram previamente submetidas à lise celular com 900 µL do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%, seguida de centrifugação por 5 minutos a 5000 RPM. A partir desta amostra, o DNA genômico foi extraído segundo o protocolo do *QIAAMP DNA BLOOD MINI kit* (PreAnalytix/Qiagen, Alemanha). A integridade das amostras do DNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com GelRedTM. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm e a pureza do DNA determinada pela

relação $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*Nanodrop Technologies*, Inc – EUA).

4.3.11 Avaliação da mutação e quantificação dos alelos (*allele burden*) $JAK2^{V617F}$

A quantificação da mutação $JAK2^{V617F}$ foi realizada no Instituto Fleury, pelo método de PCR em tempo real com sondas *Taqman*® MGB específicas para os alelos selvagem e mutado. Empregou-se o equipamento ABI 7900HT Vii7 (*Applied Biosystems*, Foster City/CA, EUA), seguindo a metodologia descrita por dos Santos e colaboradores (2014). Os primers e sondas usados estão descritos na **Tabela 9**.

Para a quantificação dos alelos, foi analisada a porcentagem de alelos mutados, estimada baseando-se nos sinais fluorescentes normalizados do alelo mutante (Rn mutante) e do alelo selvagem (Rn selvagem), localizados na região da amplificação exponencial da PCR e apresentados como porcentagem de mutação ou negativos:

$$\% \text{ mutação } JAK2^{V617F} = \text{Rn mutante} / (\text{Rn mutante} + \text{Rn selvagem})$$

Tabela 9. Características dos primers e sondas *Taqman*® empregados para quantificação dos alelos $JAK2^{V617F}$

Primer / Sonda	Sequência
Primer <i>Forward</i> ($JAK2_{198_P1}$)	5'-GCAGCAAGTATGATGAGCAAGCT-3'
Primer <i>Reverse</i> ($JAK2_{302_P2}$)	5'-GGCATTAGAAAGCCTGTAGTTTTACTTAC-3'
Sonda para o alelo selvagem (JAK_WT_FAM)	TGGAGTATGTGTCTGTGGA
Sonda para o alelo mutado (JAK_MT_VIC)	TGGAGTATGTTTCTGTGGAG

4.3.12 Detecção das mutações W515K e W515L no gene *MPL* nos pacientes negativos para a mutação $JAK2^{V617F}$

A detecção das mutações *MPL* W515L e W515K foram realizadas no Instituto Fleury, por PCR em tempo real empregando-se sondas *TaqMan*® MGB específicas para os alelos selvagem e mutados, conforme metodologia descrita por

Dos Santos e colaboradores (2014). O equipamento empregado foi o Rotor Gene 3000 (Corbett Research – Qiagen). Os primers e sondas usados estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Características dos primers e sondas Taqman® empregados para detecção das mutações *MPL*^{W515K/L}

Primer/ Sonda	Sequência
Primer <i>Forward</i>	5' – TGGTGACCGCTCTGCATCTA – 3'
Primer <i>Reverse</i>	5' – TCCACCGCCAGTCTCCTG – 3'
Sonda <i>MPL WT_VIC_MGB</i>	5' – VIC – TGAGGTGGCAGTTTC – 3 NFQ-MGB – 3'
Sonda <i>W515L_FAM_MGB</i>	5' – 6FAM – CTGCTGAGGTTGCAGTT – NFQ-MGB-3'
Sonda <i>W515K_FAM_MGB</i>	5' – 6FAM – CTGCTGAGGAAGCAGT – NFQ-MGB -3'

4.3.13 Amplificação e sequenciamento do gene *CALR*

As análises do gene *CALR* foram realizadas pelos pesquisadores Miguel Mitne Neto e Marcos Tadeu dos Santos, no Instituto Fleury.

Com base no manuscrito de Tefferi, Lasho, Finke, Knudson, *et al.* (2014), foram desenhados primers para a amplificação do éxon 9 do gene *CALR*, de modo que a região alvo estivesse contida em um único amplicon, com as seguintes modificações: (1) à porção 5' do primer *forward* foi anexada uma sequência M13F (-21) e (2) à porção 5' do primer *reverse* foi anexada uma sequência M13R, conforme apresentado na **Tabela 11**.

Tabela 11. Características dos primers empregados para a amplificação da região alvo no gene *CALR*

Primer	Sequencia 5'>3'
<i>Forward</i>	TGTAAAACGACGGCCAGTCTGGCACCATCTTTGACAACCTT
<i>Reverse</i>	CAGGAAACAGCTATGACCGGCCTCTCTACAGCTCGTC

As reações de PCR foram preparadas com 10,0 μL de PCR Mix (2x) (Promega), 0,15 μM de primers (forward e reverse), água MilliQ[®] suficiente para 20 μL e 5,0 μL de DNA. As condições de ciclagem usadas foram: 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57°C e 30 segundos a 72°C; apenas um ciclo de 10 minutos a 72°C, mantendo por 4°C em seguida.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2%, e em seguida purificados por meio do kit Illustra GFX (*GE Healthcare*, Little Chalfont/Buckinghamshire, Reino Unido). Em seguida, esses produtos foram empregados para a reação de sequenciamento. Para cada reação foram usados 2,0 μL de BigDye Terminator v3.1, 2,0 μL de BigDye Buffer v3.1 (*Applied Biosystems*, Foster City/CA, EUA), 1,0 μL de primer M13F ou M13R, 1,0 μL de QSolution (*QIAGEN*, Aarhus, Dinamarca) e 4,0 μL de amostra. A ciclagem para essa reação foi de 5 minutos a 95°C, seguidos por 25 ciclos de 30 segundos a 96°C, 20 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C, permanecendo a 4°C em seguida. A análise do sequenciamento de Sanger foi realizada em eletroforese capilar no equipamento Applied Biosystems 3130, conforme instruções do fabricante.

Os resultados foram avaliados com o auxílio da ferramenta de bioinformática CLC Bio Workbench (*Qiagen*, Aarhus, Denmark) e a estrutura secundária da proteína original foi predita pelo EMBOSS Transeq (EMBL-EBI, UK) http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/ e JPRED.

Experimentos realizados na Divisão de Hematologia da Universidade de Utah, EUA

4.3.14 Separação dos granulócitos e plaquetas de pacientes com MF, TE e PV e indivíduos do grupo controle

Nenhum dado pessoal ou clínico destes pacientes foi utilizado. O objetivo desta etapa foi confirmar os resultados obtidos em leucócitos totais dos pacientes incluídos no Brasil.

Amostras de sangue total foram coletadas em tubo com EDTA e foi realizada a separação de granulócitos e plaquetas para avaliação da expressão dos genes de interesse nesses tipos celulares.

Para a extração do RNA das plaquetas, o sangue total foi centrifugado por 10 minutos a 700 rpm e a parte superior (plasma contendo as plaquetas) foi transferida para microtubos de 1,5mL. A seguir, a amostra foi centrifugada a 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e foi adicionado 1 mL de tampão de *Erythrocyte Lysis Buffer* (Qiagen, Valencia, CA, USA). A amostra foi homogeneizada e aguardou-se 10 minutos para que a lise dos eritrócitos ocorresse. A amostra foi centrifugada a 400 x g e descartou-se o sobrenadante. 1 mL de TRI-reagente (*Molecular Research Center*, Cincinnati, OH, USA) foi adicionado à amostra e o RNA total foi extraído seguindo-se as recomendações do fabricante.

O sangue remanescente da separação das plaquetas (contendo hemácias e leucócitos) foi diluído em um tubo cônico de 50 mL (Corning Inc.) com PBS 1x na proporção de volume 1:1. Posteriormente, um volume de 7 ml do sangue foi adicionado lentamente a um tubo cônico de 15 mL (Corning Inc.) contendo 3 mL da solução de Ficoll-Hypaque (*Sigma*, St. Louis, MO, EUA) e centrifugado para a formação do anel de células mononucleares. Este foi posteriormente eliminado, permanecendo as hemácias e granulócitos, que novamente foi ressuspenso em *Erythrocyte Lysis Buffer* (Qiagen, Valencia, CA, USA) na proporção de volume de 4:1. Após 10 minutos, a amostra foi centrifugada e o processo de lise foi repetido, descartando-se o sobrenadante. Um mililitro de TRI-reagente (*Molecular Research*

Center, Cincinnati, OH, USA) foi adicionado ao *pellet* e a extração do RNA total foi feita seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.3.15 Avaliação *in vitro*

4.3.15.1 *Cultura de colônias BFU-E*

O ensaio de responsividade dos progenitores eritróides a EPO foi realizado *in vitro* como previamente descrito (Jelinek e Prchal, 2004). Resumidamente, as células mononucleares do sangue periférico foram isoladas em Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e cultivadas a uma densidade final de 3×10^5 células/mL em meio Methocult H-4531 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canadá) em placas de Petri 35 mm com 3.000 mU/mL EPO. As culturas foram mantidas a 37°C e 5% de dióxido de carbono. Todos os experimentos de hipóxia foram realizados na câmara de hipóxia umidificada (Billups-Rothenberg Inc.) a 37°C e 5% de oxigênio. Colônias eritróides individuais (**Figura 7**), selecionadas com base em critérios padronizados, foram colhidas após 14 dias em cultura, utilizando micropipetas de 10 μ L. Cem microlitros de TRI-reagente (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) foram adicionados às colônias e a extração do RNA total foi feita seguindo-se as recomendações do fabricante. A síntese do DNA complementar e a PCR em tempo real foram realizados nas mesmas condições descritas na seção 4.3.4 e 4.3.6 respectivamente.

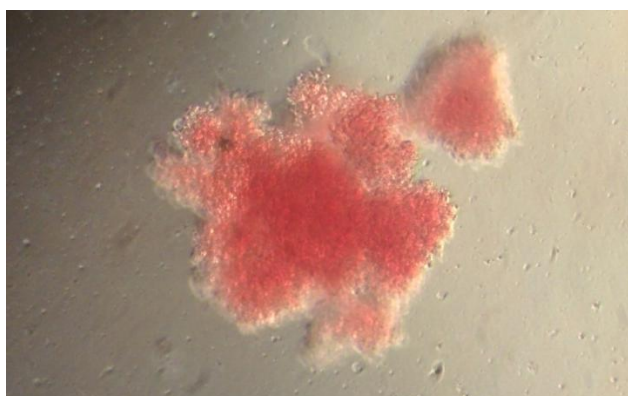


Figura 7. Colônia eritroide BFU-E, após 14 dias em cultura com 3.000 mU/mL EPO. Fotomicrografia obtida com aumento de 40 vezes

4.3.16 Avaliação em modelos animais: in vivo

Os protocolos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Utah, EUA.

4.3.16.1 Modelo com aumento da expressão de HIFs

Para testar se a expressão de MMP é mediada através da via de HIF, foram testadas as expressões gênicas em fígado de camundongos machos geneticamente modificados Chuvash (Hickey *et al.*, 2007). Estes camundongos possuem um *knockin* de perda de função de um transgene que contém uma mutação do gene von Hippel Lindau (VHL^{R200W}), causando, constitutivamente, altas concentrações de HIFs em condições de normóxia (Ang *et al.*, 2002). O tratamento de hipóxia para camundongos Chuvash (mais de 8 semanas de idade) foi realizado em uma câmara hipobárica (BioSpherix Co) durante 10 dias a 12% de oxigênio.

4.3.16.2 Modelo com diminuição da expressão de HIF

Para apoiar ainda mais a nossa hipótese de que a sinalização HIF regula a expressão das MMPs, foram analisados RNAm obtidos de saco vitelino murino $Hif1a^{-/-}$ (a deficiência HIF1a é letal no 11º dia do embrião) e de camundongos controle (Yoon *et al.*, 2006).

4.3.16.3 Testes em camundongos C57Bl/6 selvagens

Camundongos machos C57/BL6, 8 semanas de idade, foram expostos a hipóxia em uma câmara hipobárica (BioSpherix) durante 10 dias a 12% de oxigênio.

A medula óssea total foi obtida da tíbia e fêmur dos camundongos, após eutanásia. Os ossos foram macerados com auxílio de cadinho, em 1mL de PBS. As células foram filtradas com *cell strainer* de 40µm (BD falcon), centrifugadas a 400 x g por 5 minutos, ressuspensas em 5mL de tampão de lise de hemácias *Erythrocyte Lysis Buffer* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e incubadas a 4°C. Após 4 minutos, foram adicionados 5mL de PBS e realizou-se uma nova centrifugação. As células viáveis foram determinadas por contagem direta utilizando-se o corante azul de tripan.

Para a análise da expressão gênica no material total da medula óssea, foi adicionado TRI-reagente (*Molecular Research Center*, Cincinnati, OH) ao sedimento.

Para da expressão gênica em precursores LSK (Lin-, SCA-1+ c-KIT+), foram adicionados os seguintes anticorpos às células totais de medula óssea (1×10^6) ressuspendidas em tampão PBS adicionado de 1% BSA: 5 μ L de c-kit-PE, 1,2 μ L Sca-1-PerCp e 20 μ L de Lin-FITC (eBiosciences, Inc). As amostras e controles isotípicos foram incubados por 30 minutos, 4°C, no escuro. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas por 7 minutos a 1250 rpm e 4°C. As amostras foram ressuspendidas em tampão PBS e procedeu-se com a separação de células LSK em citômetro de fluxo BD FACSAria III Cell Sorter (San Jose, CA, EUA) em 488nm de excitação.

A expressão de RNAm das MMPs e TIMPs foram avaliadas nesses animais utilizando-se os seguintes ensaios TaqMan[®]: MMP2 (Mm00439498_m1), MMP9 (Mm00442991_m1), TIMP1 (Mm01341361_m1), TIMP2 (Mm00441825_m1), VEGFA (Mm00437306_m1), HIF1- α (Mm00468869_m1), HK1 (Mm00439344_m1) e 18s (Mm04277571_s1).

4.4 Análises Estatísticas

A análise estatística foi conduzida utilizando-se o *software* SPSS versão 17.0 e *Graph Pad Prism* versão 5. Para a descrição do perfil das amostras segundo as variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas e estatísticas descritivas das variáveis contínuas. Para comparar a expressão gênica entre pacientes com NMPs e indivíduos controle, foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a distribuição Gaussiana das variáveis. As concentrações de proteínas segundo os grupos com diferentes graus de DMV foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram realizados modelos de correlações de Spearman entre concentrações das proteínas e a carga alélica de *JAK2*^{V617F}. Modelos de regressão linear multivariado foram realizados para verificar a influência das variáveis independentes: expressão gênica das MMPs, TIMPs e SPARC na concentração das variáveis dependentes (MMP2, MMP9, VEGFA e bFGF). O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Dados dos pacientes com MF e TE e indivíduos controle

Os controles e pacientes com MF e TE apresentaram distribuição similar quanto à idade, gênero e presença de diabetes. Os pacientes com MFP apresentaram menor Índice de Massa Corporal (IMC) em relação ao controle ($P=0,015$), enquanto que os pacientes com TE apresentaram maior frequência de hipertensão arterial ($P=0,015$). As características dos indivíduos incluídos no estudo encontram-se descritas na **Tabela 12**.

Apenas dois pacientes com diagnóstico de MF apresentaram alteração no cariótipo: JFR, 61 anos, masculino, portador do cariótipo 46,XX,del(20)(q13)[2]/46,XX[15] e MMS, 79 anos, feminino, portadora do cariótipo 46,XY,del(20)(q11.2)[5].

Os dados hematológicos e concentrações de PCRus estão apresentados na **Tabela 13**.

Como os pacientes com MF primária e MF secundária a TE e PV não apresentaram diferenças nos dados hematológicos e PCRus, foram agrupados para simplificar a apresentação dos dados hematológicos. O grupo de pacientes com MF (MFP, MFPTe, MFPPV) e TE apresentaram menor número de hemácias do que os controles ($p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente). As concentrações de hemoglobina e hematócrito também foram menores nos pacientes com MF ($p=0,011$ e $p=0,019$, respectivamente). Os pacientes com TE exibiram maiores VCM ($p<0,001$) e HCM ($p=0,002$) do que os controles. Todos os grupos de pacientes apresentaram valores de RDW maiores do que os controles (MF: $p<0,001$; TE: $p=0,029$), bem como maiores contagens de plaquetas em relação aos controles (MF: $p<0,001$; TE: $p<0,001$).

Tabela 12. Características gerais e clínicas dos pacientes com MF e TE e dos grupos controle incluídos no estudo

Variáveis	MFP (N=21)	CONTROLE (N=38)	P valor	MF pós-TE (N=21)	CONTROLE (N=35)	P valor	MF pós-PV (N=6)	CONTROLE (N=14)	P valor	TE (N=23)	CONTROLE (N=46)	P valor
Idade (anos)*	62 (56-76)	62 (56-76)	0,905	66 (54-75)	61 (63-51)	0,565	69 (57-78)	71 (67-80)	0,482	66 (49-73)	65 (50-72)	0,784
Gênero masculino**	10 (47,6)	18 (47,4)	0,985	8 (38,1)	12 (34,3)	0,774	3 (50)	6 (42,9)	0,769	9 (39,1)	17 (37)	0,861
IMC (kg/m ²)*	25 (22-27)	26 (24-29)	0,015	24 (21-27)	26 (24-29)	0,096	23 (18-31)	26 (23-31)	0,444	25 (23-28)	26 (24-28)	0,559
Presença de diabetes**	2 (9,5)	6 (15,8)	0,491	3 (14,3)	5 (14,3)	1,000	1 (16,7)	5 (35,7)	0,394	3 (14,3)	4 (8,7)	0,498
Hipertensão arterial**	11 (52,4)	18 (47,4)	0,712	11 (52,4)	14 (40,0)	0,367	4 (66,7)	8 (57,1)	0,688	12 (57,1)	12 (26,1)	0,015
Eventos trombóticos**	2 (9,5)	2 (5,3)	0,541	2 (9,5)	0 (0)	0,044	0 (0)	0 (0)		2 (9,1)	1 (2,2)	0,213
Esplenomegalia**	6 (28,6)			6 (33,3)			1 (16,7)			2 (14,3)		
Tempo de uso de hidoxicarbamida (meses)*	7 (0-49)			9 (0-28)			22 (18-31)			57(0-96)		
Tempo de doença (meses)*	29 (5-83)			26 (16-56)			56 (26-179)			64 (24-96)		
Presença de JAK2 ^{V617F} **	11 (52,4)			12 (57,1)			5 (83,3)			13 (56,5)		
Carga alélica JAK2 ^{V617F} *	25 (9-39)			10 (9-57)			15 (7-37)			9 (9-23)		
Presença de MPL W515L**	0 (0)			0 (0)			0 (0)			1 (4,3)		
Presença de mutação CALR**	8 (38,1)			7 (17,5)			1 (16,7)			2 (8,6)		

* Os valores são mediana e intervalo interquartilico (P25-P75).

**Os dados apresentados são número e indivíduos e porcentagem entre parênteses.

†: Não foi possível determinar o IMC de 2 pacientes com MF e 2 com TE

‡: Não foi possível localizar dados referentes a esplenomegalia nos prontuários de 6 pacientes com MF e 5 pacientes com TE.

* Foi utilizado o teste de Mann Whitney; ** Foi utilizado o teste do Qui quadrado

Tabela 13. Dados hematológicos e de PCR ultrasensível dos pacientes com MF (MFP, MFPTE e MFPPV) e TE e seus controles

	MF (N=50)	CONTROLE (N=59)	P valor	TE (N=24)	CONTROLE (N=48)	P valor
Hemácias (x10⁶ /mm³)	4,2 (3,4-4,9)	4,7 (4,4-4,9)	<0,001	3,6 (3,3-4,7)	4,8 (4,3-5,1)	<0,001
Hemoglobina (g/dL)	13,3 (11,7- 15,4)	14,4 (13,3-15,3)	0,011	13,8 (12,3- 14,9)	14,1 (13,1-15,4)	0,216
Hematócrito (%)	38,9 (34,7-45,1)	41,9 (39,2-44,8)	0,019	40,8 (35,7-42,9)	41,5 (38,1-44,8)	0,311
VCM (fL)	90,3 (84,2-103,0)	89,3 (86,9-92,5)	0,291	100,0 (88,7-112,3)	87,8 (83,2-90,4)	<0,001
HCM (pg)	30,7 (28,5-35,7)	30,8 (29,5-31,5)	0,332	33,0 (29,5-38,2)	29,9 (28,5-30,8)	0,002
CHCM (g/dL)	34,0 (33,6-34,6)	34,2 (33,6-34,6)	0,500	33,8 (33,1-34,4)	34,2 (33,4-34,6)	0,180
RDW (%)	16,6 (14,6-19,5)	13,5 (12,8-13,8)	<0,001	14,1 (13,2-15,0)	13,4 (12,9-13,9)	0,029
Leucócitos (x10³ /mm³)	7,4 (5,2-11,2)	6,6 (5,1-7,8)	0,131	7,4 (5,8-9,9)	6,8 (4,9-7,8)	0,078
Plaquetas (x10³ /mm³)	426 (227-669)	208 (186-242)	<0,001	540 (361-688)	217 (190-243)	<0,001
PCRus (mg/dL)	0,16 (0,05-0,30)	0,16 (0,06-0,37)	0,801	0,22 (0,09-0,72)	0,21 (0,07-0,46)	0,468

MF: mielofibrose (inclui MF primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial e mielofibrose pós-policitemia vera), TE: trombocitemia essencial.

Os valores apresentados são mediana e intervalo interquartilico (P25-P75); a comparação entre os grupos de doenças e controles foram realizadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney. VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: *red cell distribution width* (variação de tamanho); PCRus: Proteína C reativa ultrasensível.

5.2 Pacientes com cariótipo alterado

O cariótipo foi obtido com sucesso em 50 dos 66 pacientes incluídos nas análises, não tendo sido possível avaliar o cariótipo de 6 pacientes com MFP, 4 com MFPTE e 6 com TE. Foram encontrados dois pacientes com cariótipo alterado. As principais características desses pacientes estão apresentadas a seguir.

Um paciente, gênero masculino, tinha diagnóstico de MFPTE, e seu cariótipo foi 46,XY,del(20)(q11.2)[5]. Sua idade, de 61 anos, estava próxima às dos demais (66 anos), e seu IMC de 26,1 kg/m² também era próximo à mediana de 23,9 kg/m² dos pacientes com MFPTE. Era hipertenso, e sua concentração de PCRus de 0,03 mg/dL foi menor do que a mediana do grupo (0,12 mg/dL). Seu tempo de doença (47 meses) e tempo de uso de hidoxicarbamida (22 meses; dose de 1000 mg/dia) foram bem maiores do que a mediana dos demais (26 meses, 9 meses, respectivamente). Esse paciente era positivo para a mutação *JAK2*^{V617F}, e sua carga alélica era de 70,8%, muito acima da mediana de seu grupo (9,9%). Além disso, e as alterações apresentadas no hemograma desse paciente foram: RDW aumentado, leucopenia e plaquetopenia discretas.

Outro paciente, gênero feminino, tinha diagnóstico de MFP, e seu cariótipo foi 46,XX,del(20)(q13)[2]/46,XX[15], apresentando risco DIPSS-Plus intermediário 2. Sua idade, de 80 anos, era bastante avançada em relação à mediana do grupo (60 anos), e seu IMC de 30,4 kg/m² era maior do que a mediana dos pacientes com MFP (24,7 kg/m²). Era hipertensa, e sua concentração de PCRus de 0,15 foi menor em relação à mediana do seu grupo (0,27 mg/dL). Seu tempo de doença (24 meses) era próximo à mediana dos demais (29 meses), embora o tempo de uso de hidoxicarbamida (23 meses) tenha sido bem maior do que a mediana do seu grupo (7 meses). Essa paciente era positiva para a mutação *JAK2*^{V617F}, e sua carga alélica era de 79,7%, muito acima da mediana de seu grupo (25,5%). Essa paciente ainda apresentou aumento do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito, além de leucocitose acentuada e plaquetose discreta.

5.3 Avaliação do prognóstico dos pacientes com mielofibrose primária

Na **Tabela 14** estão apresentadas as frequências dos grupos de classificação de risco DIPSS-Plus dos pacientes com MFP. Apenas dois apresentaram pacientes com risco alto, enquanto os demais apresentaram os outros escores.

Tabela 14. Classificação de risco DIPSS-Plus dos pacientes com mielofibrose primária

Escore	Frequência (%)
Baixo	6 (28,6)
Intermediário 1	6 (28,6)
Intermediário 2	7 (33,4)
Alto	2 (9,5)

Os dois pacientes que apresentaram risco alto tinham cariótipo normal. Um dos pacientes, gênero masculino, 59 anos, com 79 meses de duração da doença, usava hidroxycarbamida há 50 meses (dose 1.500 mg/dia) e apresentou a mutação *CALR* tipo 1. Os fatores de risco por ele apresentados eram concentração de hemoglobina menor que 10 g/dL, presença de blastos no sangue periférico, perda de peso, e contagem de plaquetas abaixo de $100 \times 10^9/L$. O outro paciente do gênero masculino, 76 anos, com 7 meses de diagnóstico da doença e 50 meses de uso de hidroxycarbamida (dose 500 mg/dia) apresentou a mutação *JAK2*^{V617F} (carga alélica de 72,9%). Os fatores de risco por ele apresentados eram idade maior que 65 anos, presença de blastos no sangue periférico, perda de peso e contagem de plaquetas abaixo de $100 \times 10^9/L$.

A carga alélica da mutação *JAK2*^{V617F} não foi diferente segundo a classificação de risco DIPSS-Plus nos pacientes com MF ($P=0,903$) quando foi considerado os quatro grupos de escores. Também, não houve diferença na carga alélica da mutação quando foram agrupados os grupos de risco baixo + intermediário 1 *versus* grupos intermediário 2 + alto ($P= 0,862$).

5.4 Expressão de RNAm e dosagem das concentrações de MMPs, TIMPs, SPARC, b-FGF e VEGFA nos casos e controles

Para melhor compreensão decidiu-se apresentar os dados de acordo com a doença: MF ou TE. Primeiramente serão apresentados os resultados das expressões gênicas (RNAm), seguido da expressão proteica e finalmente, modelos de regressão linear multivariadas para as variáveis dependentes: MMP2, MMP9, VEGFA e b-FGF.

5.4.1 Mielofibrose

5.4.1.1 Comparação da expressão de RNAm dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC entre pacientes com MF e grupo controle

Os pacientes com MFP (**Figura 8A**) e MPPTe (**Figura 8F**) apresentaram maior expressão de MMP2 ($P < 0,001$ e $P = 0,021$ respectivamente) quando comparados aos controles. Apenas os pacientes com MPPTe apresentaram maior expressão de MMP9 em relação ao grupo controle (**Figura 8G**; $P = 0,011$). A expressão de SPARC foi maior nos pacientes com MFP e MPPTe do que no grupo controle (**Figura 8E e 8J**; $P = 0,021$ e $P = 0,03$ respectivamente).

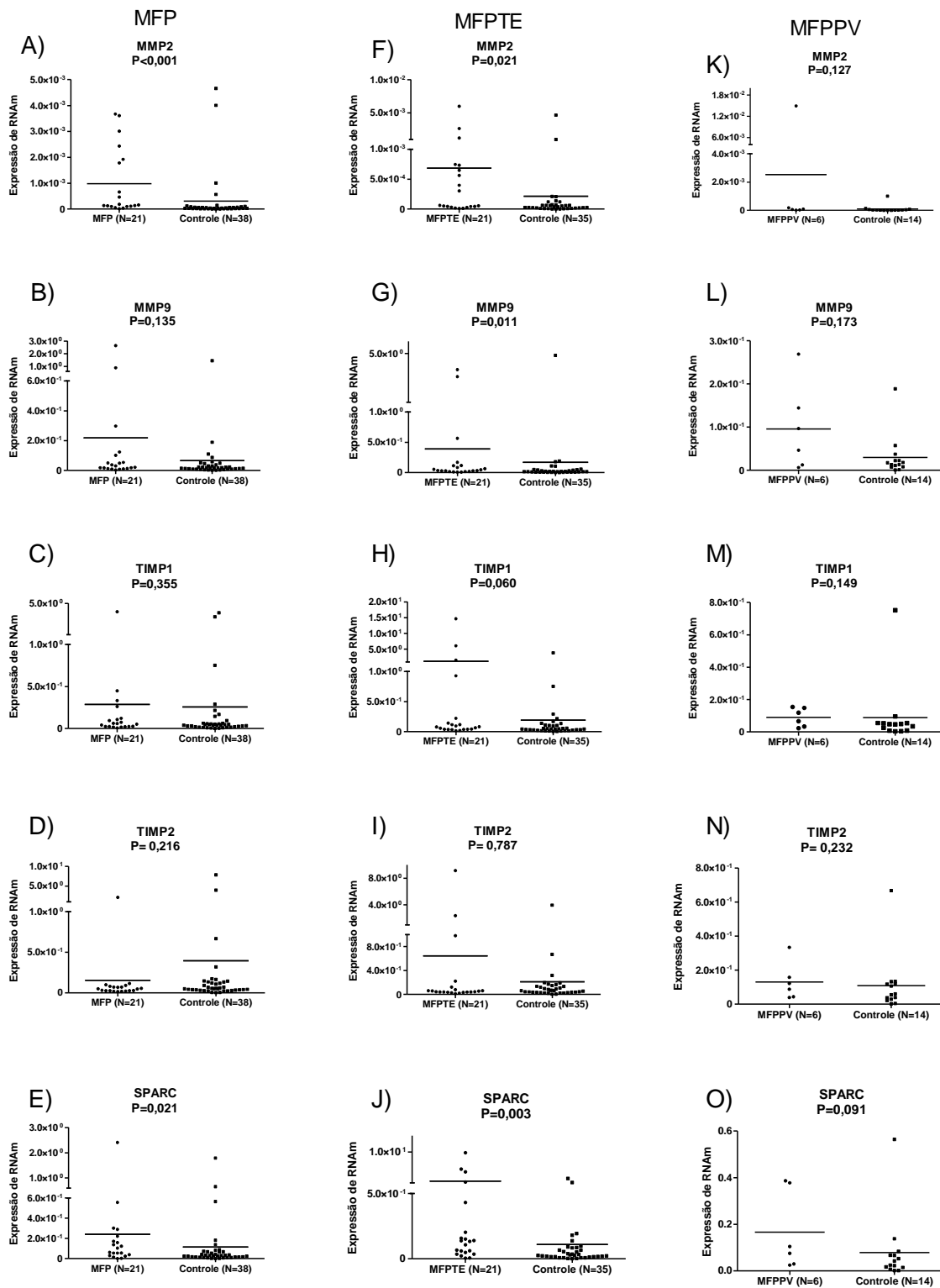


Figura 8. Expressão de RNAm dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC nos pacientes com MF (MFP, MFPTe e MFPPV) e grupo controle

Nota: A expressão do mRNA foi medida por PCR em tempo real e normalizada com os genes de referência *ACTB1* e *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As expressões de RNAm entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney

A expressão de HIF1- α foi similar nos três grupos de pacientes quando comparados aos controles ($P>0,05$; **Figura 9**).

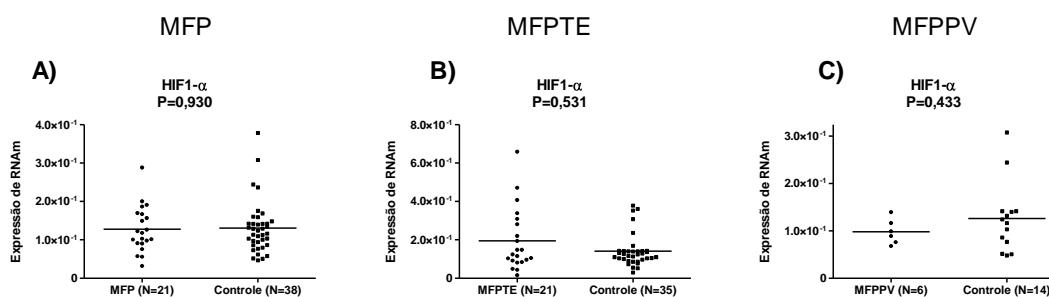


Figura 9. Expressão de RNAm do gene HIF1- α nos pacientes com MF (MFP, MFPTe e MFPPV) e grupo controle

Nota: A expressão do mRNA foi medida por PCR em tempo real e normalizada com os genes de referência *ACTB1* e *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As expressões de RNAm entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney.

5.4.1.2 Comparação das concentrações das proteínas MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC entre os pacientes com MF e grupo controle

Os dados referentes às comparações das concentrações proteicas dos pacientes com MF e seus controles estão apresentados na **Figura 10**.

Não houve diferença nas concentrações séricas de MMP2 e MMP9 entre os três grupos analisados ($P>0,05$), entretanto as concentrações séricas de TIMP1 e plasmáticas de FGF foram maiores nos grupos de MF quando comparadas com os grupos controle (**Figura 10 C, I, O, F, L, R**; $P<0,05$). Maiores concentrações de TIMP2 foram encontradas nos pacientes com MFP e MFPTe (**Figura 10 D e J**; $P<0,001$). As concentrações de SPARC nos pacientes com MFP, MFPTe e MFPPV foram similares com as concentrações dos controles (dados não mostrados na Figura 10, $P>0,05$).

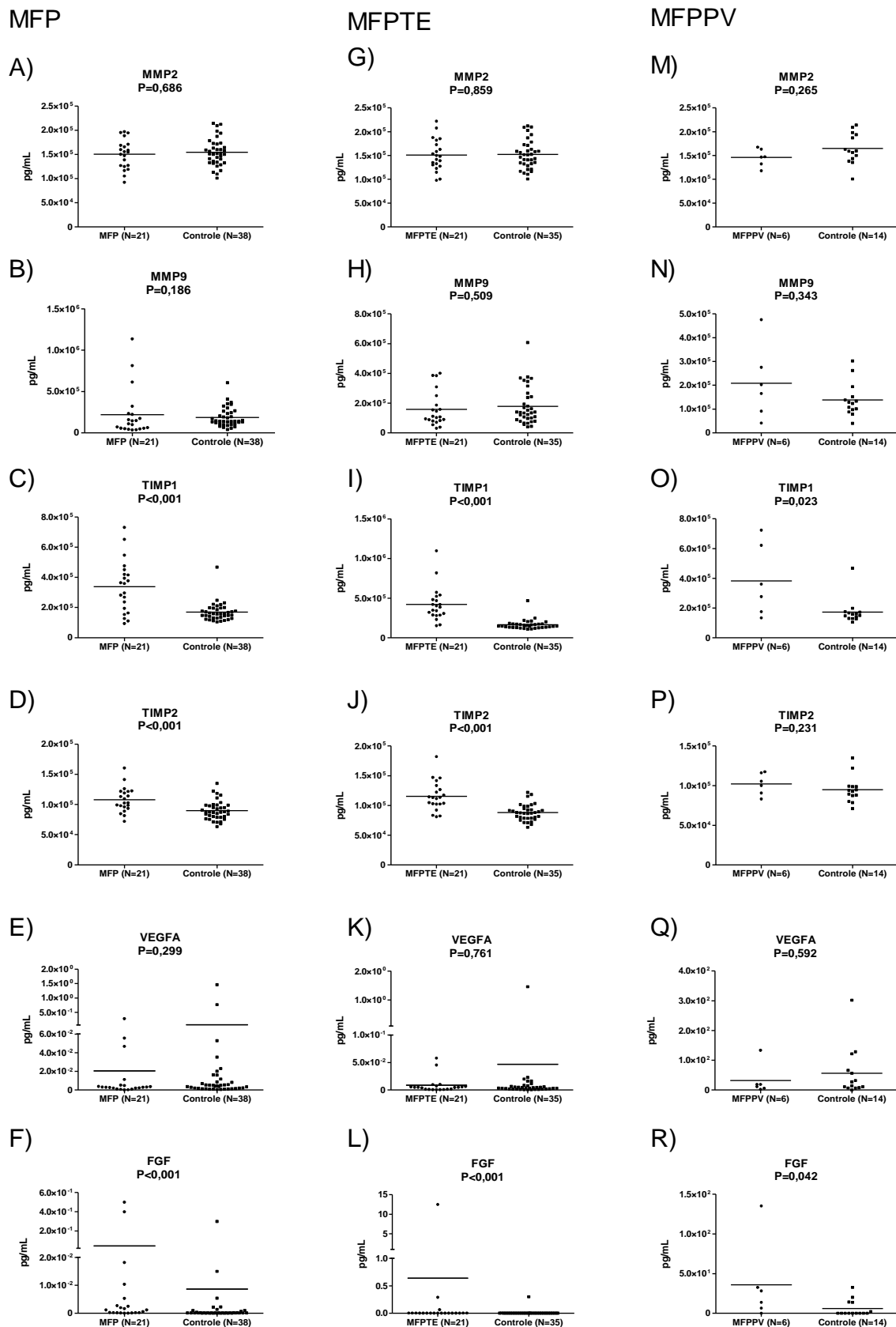


Figura 10. Concentrações séricas das proteínas MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 e plasmáticas de VEGFA e FGF nos pacientes com MF e grupo controle

Nota: As concentrações foram determinadas utilizando-se a Tecnologia Luminex™ xMAP. As concentrações dos analitos entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney

5.4.1.3 Expressão gênica de MMP2, MMP9, TIMP2, SPARC, HIF1- α , bFGF e VEGFA segundo os grupos de classificação de risco DIPSS-Plus em pacientes com MFP

A expressão de RNAm de SPARC e a concentração de TIMP1 foram maiores no grupo de pacientes com risco baixo e intermediário 1 (Grupo 1) quando comparado ao grupo de pacientes com maior risco (intermediário 2 + alto risco, Grupo 2) ($P < 0,05$; **Figura 11**).

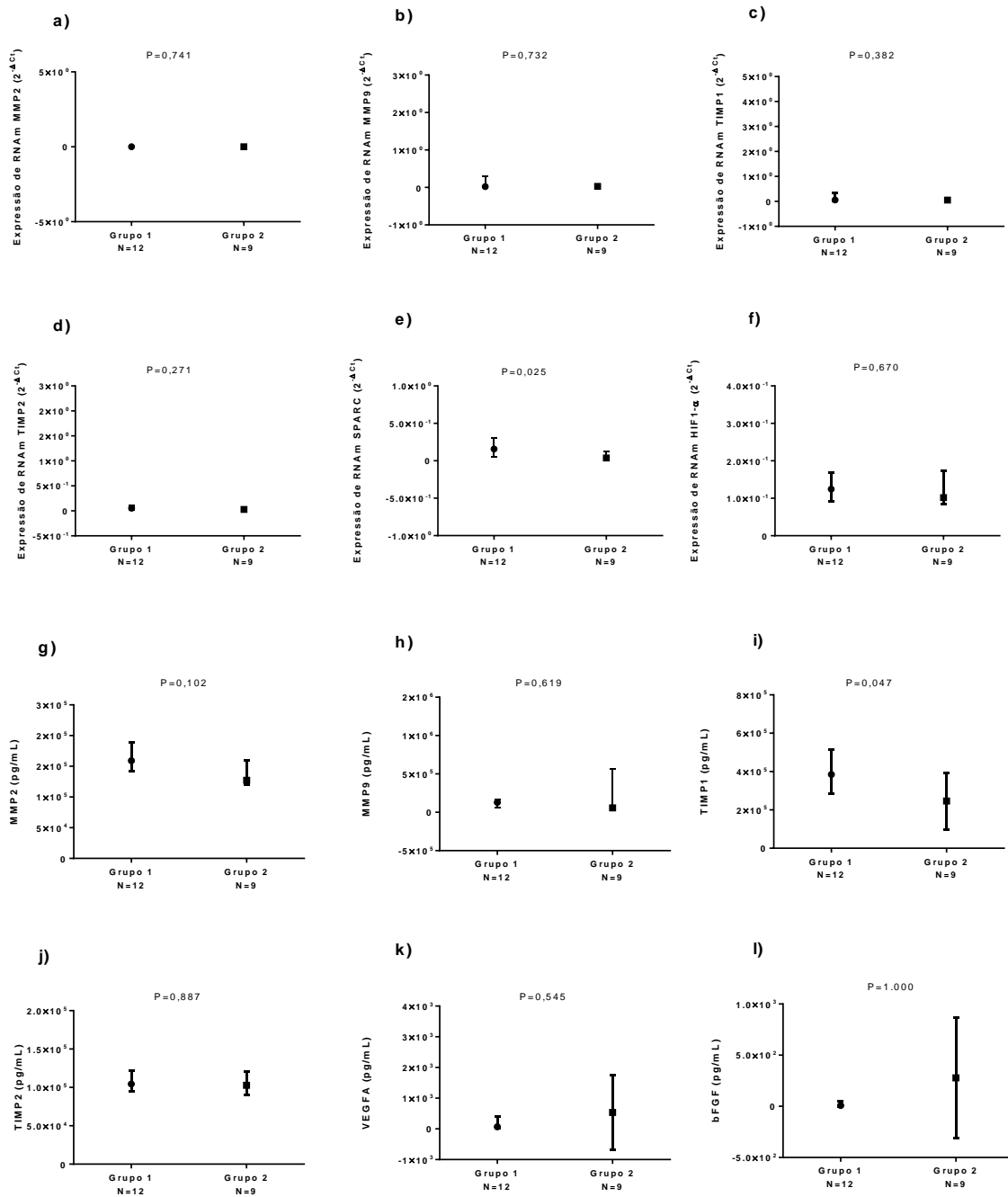


Figura 11. Expressão de RNAm e concentração das proteínas segundo a classificação DIPSS-plus em pacientes com MFP

Grupo 1: baixo + intermediário 1 e Grupo 2: intermediário 2 + alto. Os dados foram comparados utilizando o teste Mann-Whitney

5.4.1.4 Modelos de regressão linear multivariada para as variáveis dependentes Ln da concentração de MMP2, MMP9, bFGF e VEGFA nos pacientes com MF e seus controles

Modelos de regressão linear multivariada foram realizados para cada variável dependente (Ln da expressão de RNAm de *MMP2* ou de *MMP9*). Nos grupos de pacientes com MFP, MFTE e TE e nos grupos de controles saudáveis, as variáveis independentes (expressão de RNAm de *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* e *HIF1- α*) não foram associadas com as variáveis dependentes estudadas (dados não apresentados em Tabelas).

Quatro modelos de regressão linear multivariada, para cada grupo (tanto pacientes quanto seus controles) foram realizados com o intuito de avaliar quais variáveis independentes explicam a variabilidade das concentrações de MMP2, MMP9, VEGFA, bFGF (variáveis transformadas em Ln) (**Tabela 15 a 20**).

No grupo de MF, o aumento de 1 Ln de *TIMP1* foi associado com a redução de 2,746 do Ln de *MMP9*. Por sua vez, o aumento de 1 Ln da *TIMP2* foi associado com o aumento de 5,120 do Ln da *MMP9* e esta variável independente explicou 62,3% da variabilidade do Ln *MMP9* (**Tabela 15**). No grupo controle, o aumento de 1 Ln de *MMP9* foi associado com a redução de 2,972 do Ln de *VEGFA* e explicou 48,7% da variabilidade desta variável (**Tabela 16**).

Tabela 15. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de pacientes com MFP

Modelos	Variáveis dependentes	Variáveis independentes	β	Erro padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de MMP2	Ln TIMP1(pg/mL)	0,274	0,202	0,208	0,217
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-0,234	0,318	0,072	0,485
		Ln SPARC (ng/mL)	-0,049	0,085	0,046	0,580
2	Ln de MMP9	Ln TIMP1 (pg/mL)	-2,746	0,956	0,542	0,024
		Ln TIMP2 (pg/mL)	5,120	1,508	0,623	0,012
		Ln SPARC (ng/mL)	0,677	0,403	0,287	0,137
3	Ln de FGF	Ln MMP9 (pg/mL)	-0,270	3,180	0,007	0,946
		Ln MMP2 (pg/mL)	-6,411	23,812	0,068	0,833
		Ln TIMP1 (pg/mL)	1,419	6,240	0,049	0,858
		Ln TIMP2 (pg/mL)	6,164	11,671	0,218	0,691
		Ln SPARC (ng/mL)	0,141	2,409	0,003	0,963
4	Ln de VEGF	Ln MMP9 (pg/mL)	0,147	1,128	0,006	0,905
		Ln MMP2 (pg/mL)	-1,400	6,212	0,017	0,836
		Ln TIMP1 (pg/mL)	2,407	2,961	0,181	0,476
		Ln TIMP2 (pg/mL)	5,088	4,389	0,309	0,330
		Ln SPARC (ng/mL)	-0,383	1,215	0,032	0,773

Foi realizada regressão linear multivariada (modelo enter). Em negrito foram apresentadas as associações significantes

Tabela 16. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de controles de MFP

Modelos	Variáveis dependentes	Variáveis independentes	B	Erro padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de MMP2	Ln TIMP1(pg/mL)	-0,231	0,341	0,030	0,508
		Ln TIMP2 (pg/mL)	0,364	0,221	0,153	0,120
		Ln SPARC (ng/mL)	0,075	0,051	0,125	0,163
2	Ln de MMP9	Ln TIMP1 (pg/mL)	-1,109	1,157	0,058	0,353
		Ln TIMP2 (pg/mL)	1,301	0,750	0,167	0,103
		Ln SPARC (ng/mL)	0,122	0,174	0,032	0,495
3	Ln de bFGF	Ln MMP2 (pg/mL)	0,153	6,024	0,0002	0,981
		Ln MMP9 (pg/mL)	0,117	1,464	0,002	0,940
		Ln TIMP1 (pg/mL)	-2,116	10,048	0,011	0,843
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-4,731	8,088	0,079	0,590
		Ln SPARC (ng/mL)	0,690	2,891	0,014	0,823
4	Ln de VEGF	Ln MMP2 (pg/mL)	-3,780	3,004	0,150	0,240
		Ln MMP9 (pg/mL)	-2,972	1,017	0,487	0,017
		Ln TIMP1 (pg/mL)	-4,753	3,733	0,153	0,235
		Ln TIMP2 (pg/mL)	1,116	3,467	0,011	0,755
		Ln SPARC (ng/mL)	1,031	0,588	0,255	0,113

Foi realizada regressão linear multivariada (modelo enter). Em negrito foram apresentadas as associações significantes

5.4.1.5 Modelos de regressão linear multivariada para as variáveis dependentes Ln da concentração de MMP2, MMP9, bFGF e VEGFA nos pacientes com MFPTe e seus controles

Assim como para MFP, a associação entre as concentrações de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC, bFGF e VEGFA foi analisada por regressão linear multivariada e os dados estão apresentados nas **Tabelas 17 e 18**.

No grupo MFPTe, o aumento de 1 Ln de TIMP1 foi associado ao aumento de 5,302 da variável dependente Ln de bFGF explicando 65,1% da variabilidade de Ln de bFGF (modelo 3). O aumento de 1 Ln de SPARC foi associado com a redução de 2,397 do Ln de bFGF sendo esta variação explicada 78,7% pela variável independente (**Tabela 17**).

Tabela 17. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de pacientes com MFTE

Modelos	Variáveis dependentes	Variáveis independentes	β	Erro padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de MMP2	Ln TIMP1 (pg/mL)	-0,437	0,149	0,015	0,681
		Ln TIMP2 (pg/mL)	0,756	0,242	0,011	0,703
		Ln SPARC (ng/mL)	0,184	0,083	0,050	0,575
2	Ln de MMP9	Ln TIMP1 (pg/mL)	-1,244	0,592	0,306	0,062
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-0,231	0,962	0,006	0,815
		Ln SPARC (ng/mL)	-0,095	0,329	0,008	0,779
3	Ln de FGF	Ln MMP2 (pg/mL)	5,793	2,416	0,534	0,062
		Ln MMP9 (pg/mL)	1,262	0,614	0,458	0,095
		Ln TIMP1 (pg/mL)	5,302	1,735	0,651	0,028
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-4,548	2,304	0,438	0,105
		Ln SPARC (ng/mL)	-2,397	0,558	0,787	0,008
4	Ln de VEGF	Ln MMP2 (pg/mL)	-0,423	3,383	0,002	0,904
		Ln MMP9 (pg/mL)	0,964	0,850	0,138	0,289
		Ln TIMP1 (pg/mL)	0,777	2,605	0,011	0,773
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-1,535	3,076	0,030	0,631
		Ln SPARC (ng/mL)	-0,956	0,862	0,133	0,300

Foi realizada regressão linear multivariada (modelo enter). Em negrito foram apresentadas as associações significantes

No grupo controle de MFTE (**Tabela 18**), o Ln de MMP2 e de TIMP1 foram associados positivamente a Ln de bFGF explicando 90,1% e 83,0% da diferença desta variável dependente (Modelo 3). Diferentemente, TIMP2 e SPARC foram associadas negativamente a Ln de bFGF2 e explicou 88,7% e 80,1% da variação desta variável dependente, respectivamente (modelo 3).

Tabela 18. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de controles de MFTE

Modelos	Variáveis dependentes	Variáveis independentes	β	Erro padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de MMP2	Ln TIMP1 (pg/mL)	-0,071	0,370	0,003	0,852
		Ln TIMP2 (pg/mL)	0,276	0,354	0,045	0,449
		Ln SPARC (ng/mL)	0,063	0,052	0,102	0,246
2	Ln de MMP9	Ln TIMP1 (pg/mL)	-1,671	1,453	0,092	0,271
		Ln TIMP2 (pg/mL)	2,021	1,391	0,140	0,170
		Ln SPARC (ng/mL)	0,150	0,204	0,040	0,474
3	Ln de FGF	Ln MMP2 (pg/mL)	7,057	1,352	0,901	0,014
		Ln MMP9 (pg/mL)	-0,708	0,286	0,671	0,090
		Ln TIMP1 (pg/mL)	7,064	1,846	0,830	0,031
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-11,343	2,327	0,887	0,017
		Ln SPARC (ng/mL)	-1,959	0,564	0,801	0,040
4	Ln de VEGF	Ln MMP2 (pg/mL)	-0,175	2,759	0,001	0,951
		Ln MMP9 (pg/mL)	-0,212	0,858	0,008	0,811
		Ln TIMP1 (pg/mL)	5,914	4,028	0,213	0,180
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-15,635	5,344	0,517	0,019
		Ln SPARC (ng/mL)	-0,046	0,536	0,001	0,934

Foi realizada regressão linear multivariada (modelo enter). Em negrito foram apresentadas as associações significantes

5.4.2 Trombocitemia essencial

5.4.2.1 Avaliação da expressão de RNAm dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *SPARC* nos pacientes com TE e grupo controle

Os pacientes com TE apresentaram maior expressão de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *SPARC* e *HIF1- α* em relação ao controle ($P < 0,05$; **Figura 12, A, B, C e E**).

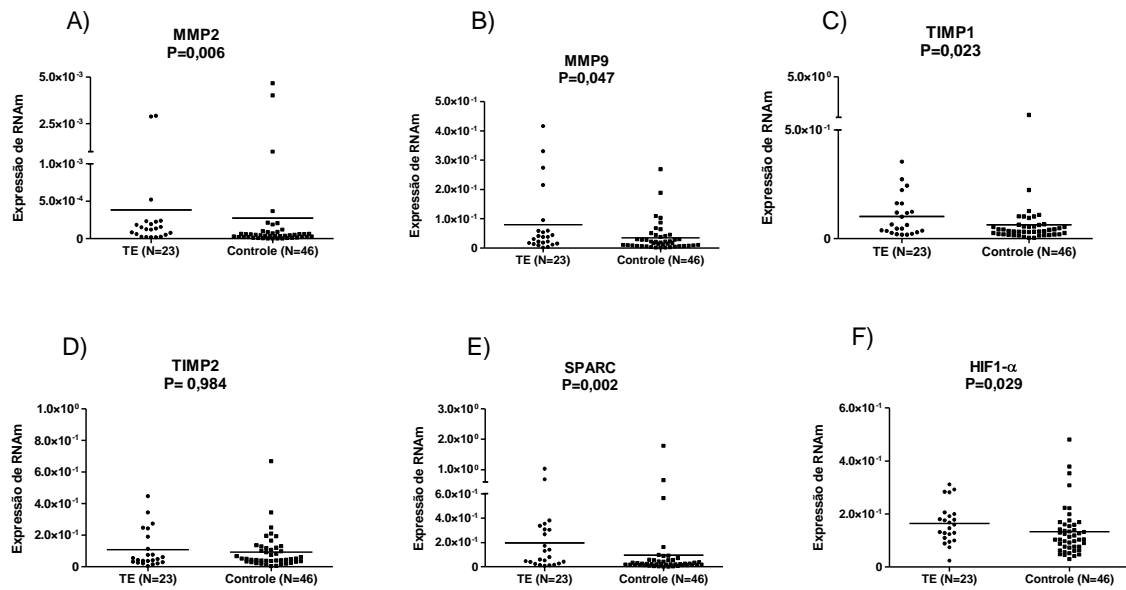


Figura 12. Expressão de RNAm dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* e *HIF1- α* nos pacientes com TE e grupo controle

Nota: A expressão do mRNA foi medida por PCR em tempo real e normalizada com os genes de referência *ACTB1* e *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As expressões de RNAm entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney

5.4.2.2 Avaliação das concentrações séricas das proteínas *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *SPARC* nos pacientes com TE e grupo controle

As concentrações de *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC*, *VEGFA* e *bFGF* foram maiores no grupo de TE quando comparadas com o grupo controle ($P < 0,05$; **Figura 13 C, D E, F e G**).

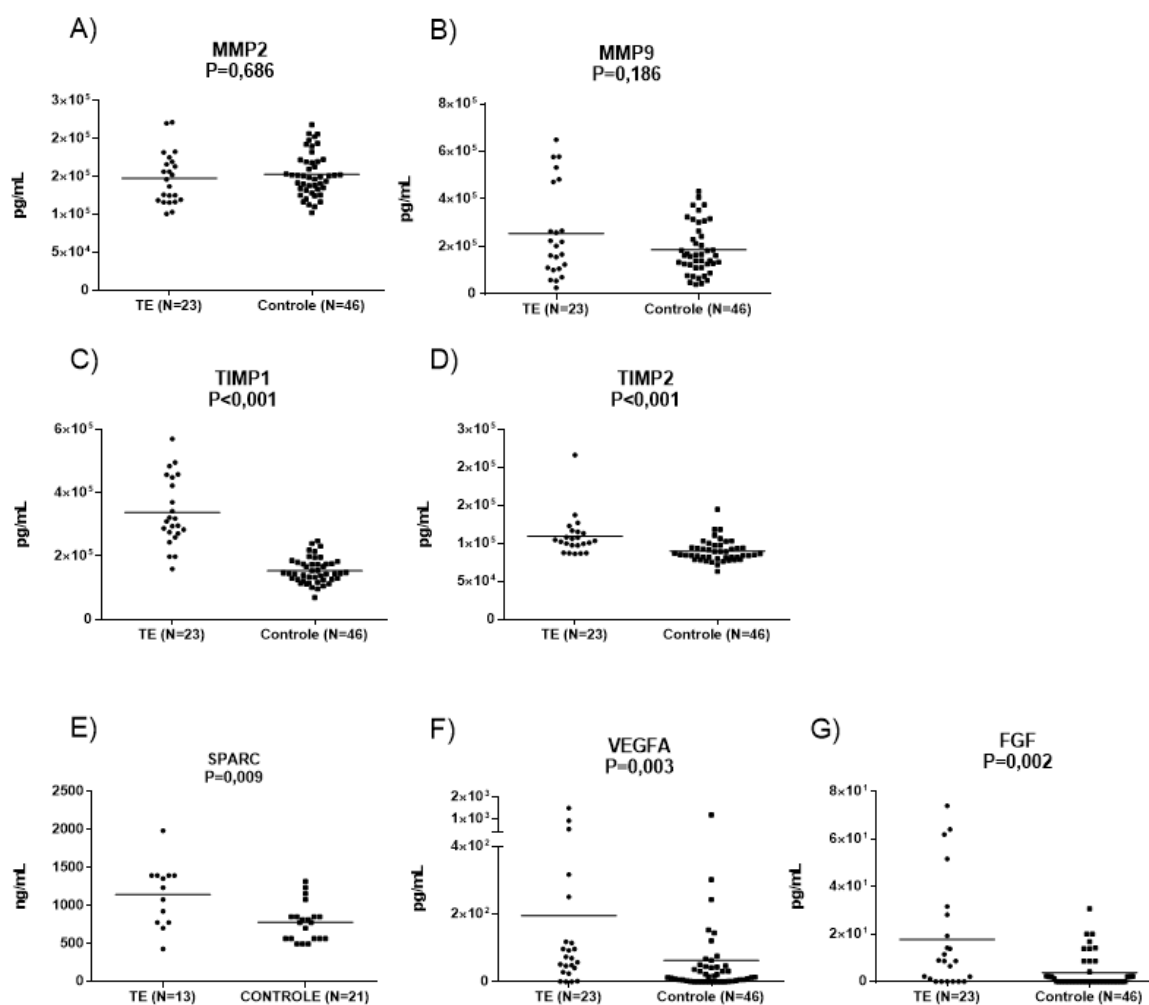


Figura 13. Concentrações das proteínas MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, SPARC, VEGFA e FGF nos pacientes com TE e grupo controle

Nota: As concentrações foram determinadas utilizando-se a Tecnologia Luminex™ xMAP. As concentrações dos analitos entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney

5.4.2.3 Modelos de regressão linear multivariada para as variáveis dependentes Ln da concentração de MMP2, MMP9, bFGF e VEGFA nos pacientes com TE e seus controles

Na TE, o Ln de TIMP2 foi associado positivamente a variável dependente Ln de MMP2, cuja variação é explicada 46,5% pela variável independente (modelo1, **Tabela 19**). Já no grupo controle o aumento de 1 Ln de MMP9 foi associado com a redução de 1,158 Ln na concentração de bFGF (modelo 3, **Tabela 20**).

Tabela 19. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de pacientes com TE

Modelos	Variáveis dependentes	Variáveis independentes	B	Erro padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de MMP2	Ln TIMP1(pg/mL)	-0,227	0,145	0,215	0,151
		Ln TIMP2 (pg/mL)	0,476	0,170	0,465	0,021
		Ln SPARC (ng/mL)	0,041	0,121	0,013	0,739
2	Ln de MMP9	Ln TIMP1 (pg/mL)	-0,761	1,114	0,049	0,512
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-1,883	1,309	0,187	0,184
		Ln SPARC (ng/mL)	0,279	0,930	0,010	0,771
3	Ln de FGF	Ln MMP2 (pg/mL)	-1,755	3,415	0,062	0,634
		Ln MMP9 (pg/mL)	-0,603	0,593	0,205	0,367
		Ln TIMP1 (pg/mL)	2,131	2,551	0,148	0,451
		Ln TIMP2 (pg/mL)	0,625	3,221	0,009	0,856
		Ln SPARC (ng/mL)	-1,589	1,953	0,142	0,461
4	Ln de VEGF	Ln MMP2 (pg/mL)	1,912	4,451	0,036	0,685
		Ln MMP9 (pg/mL)	1,387	0,772	0,393	0,132
		Ln TIMP1 (pg/mL)	1,051	3,325	0,020	0,765
		Ln TIMP2 (pg/mL)	5,281	4,197	0,240	0,264
		Ln SPARC (ng/mL)	0,743	2,542	0,017	0,782

Foi realizada regressão linear multivariada (modelo enter). Em negrito foram apresentadas as associações significantes

Tabela 20. Modelos de regressão linear multivariada nas amostras de controles de TE

Modelos	Variáveis dependentes	Variáveis independentes	β	Erro padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de MMP2	Ln TIMP1(pg/mL)	0,211	0,130	0,134	0,123
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-0,062	0,245	0,004	0,801
		Ln SPARC (ng/mL)	-0,156	0,103	0,119	0,148
2	Ln de MMP9	Ln TIMP1 (pg/mL)	-0,346	0,561	0,022	0,546
		Ln TIMP2 (pg/mL)	0,667	1,057	0,023	0,536
		Ln SPARC (ng/mL)	-0,011	0,444	0,001	0,980
3	Ln de FGF	Ln MMP2 (pg/mL)	-1,253	2,220	0,051	0,593
		Ln MMP9 (pg/mL)	-1,158	0,453	0,521	0,043
		Ln TIMP1 (pg/mL)	-1,533	1,875	0,100	0,445
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-1,917	2,854	0,070	0,527
		Ln SPARC (ng/mL)	0,139	0,959	0,003	0,889
4	Ln de VEGF	Ln MMP2 (pg/mL)	4,137	3,205	0,192	0,238
		Ln MMP9 (pg/mL)	0,843	0,810	0,134	0,332
		Ln TIMP1 (pg/mL)	0,479	3,120	0,003	0,882
		Ln TIMP2 (pg/mL)	-11,719	4,993	0,441	0,051
		Ln SPARC (ng/mL)	-1,653	1,350	0,176	0,260

Foi realizada regressão linear multivariada (modelo enter). Em negrito foram apresentadas as associações significantes

5.5 Expressão de CD34 em biópsias de medula óssea de pacientes com MF e TE

A expressão de CD34 apresentou valores similares nos grupos de pacientes com MFP, TE, MFPTe e MFPPV. As frequências dos escores das expressões de cada grupo de pacientes estão apresentadas na **Tabela 21**.

Tabela 21. Frequências de expressão de CD34 obtidas por imunohistoquímica em medula óssea de pacientes com MFP, MFPTe, MFPPV e TE

ESCORE	MFP (N=8)	TE (N=10)*	MFPTe (N=8)	MFPPV (N=4)
1	3 (37,5)	5 (50,0)	4 (50,0)	3 (75,0)
2	-	3 (30,0)	1 (12,5)	-
3	1 (12,5)	1 (10,0)	-	-
4	4 (50,0)	1 (10,0)	3 (37,5)	1 (25,0)

Os dados apresentados são os números de pacientes e entre parênteses as porcentagens de pacientes em relação ao número total analisado

Além disso, a imunoexpressão de CD34, que representa a densidade microvascular (DMV), não foi associada à expressão de RNAm de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* e *HIF1- α* e tampouco às concentrações de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, VEGFA e FGF nos três grupos de pacientes estudados (**Figuras 14, 15 e 16**). Pacientes com MFPTe apresentaram tendência ao aumento de expressão de *HIF1- α* ($P=0,088$; **Figura 15F**), bem como, os pacientes com TE que tenderam a apresentar a concentração mais alta de VEGFA ($P=0,086$; **Figura 16K**) no grupo constituído pelos pacientes com escores 2, 3 e 4 quando comparados aos pacientes com grau 1 de marcação para CD34. O grupo MFPPV não foi incluído nesta análise devido ao pequeno número amostral (N=4).

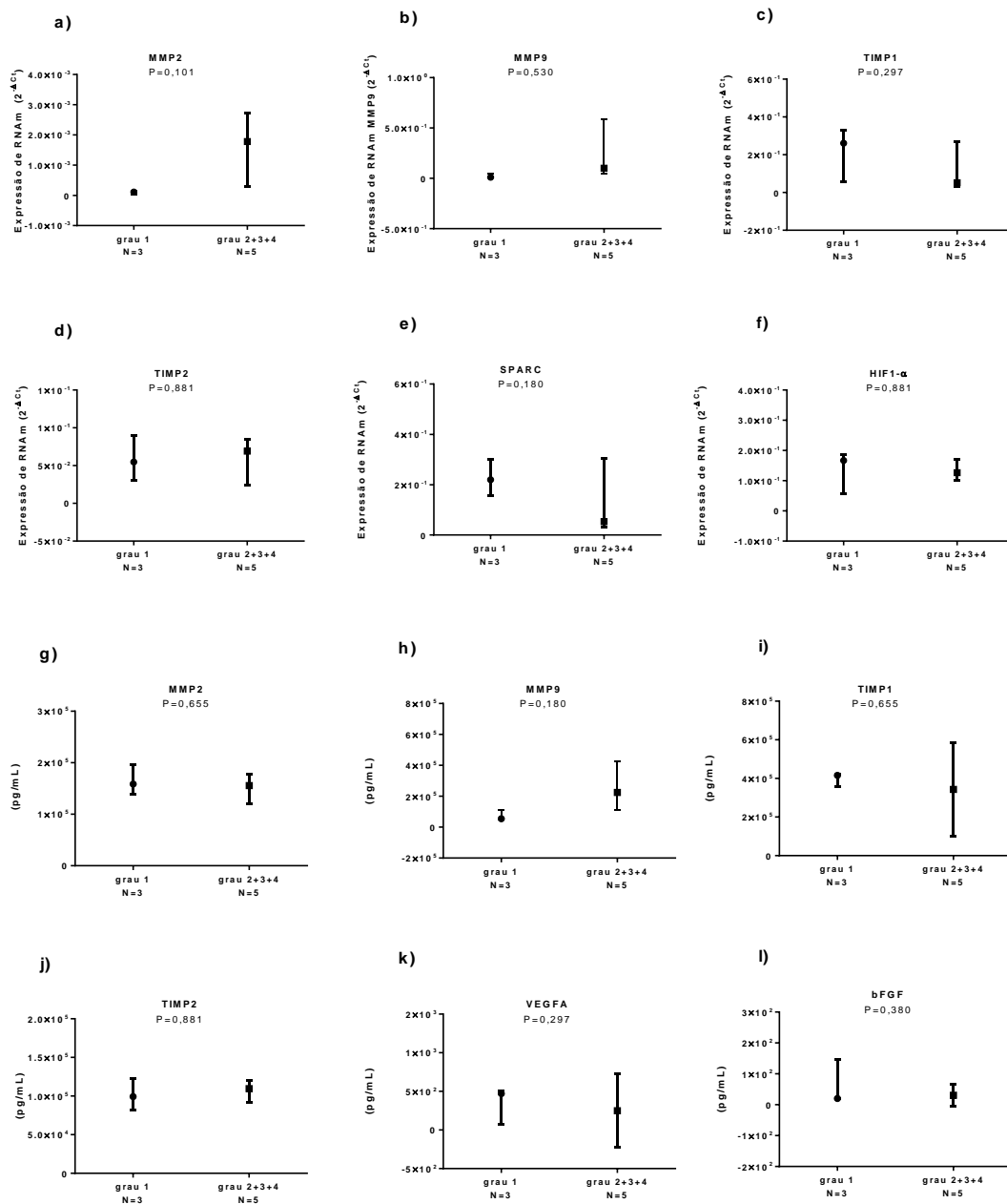


Figura 14. Expressão de RNAm de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* e *HIF1-α* e concentrações das proteínas *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* *HIF1-α*, *VEGFA* e *FGF*, segundo a expressão de *CD34* em biópsias de medula óssea dos pacientes com MFP

As Expressões de RNAm e concentrações dos analitos entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney

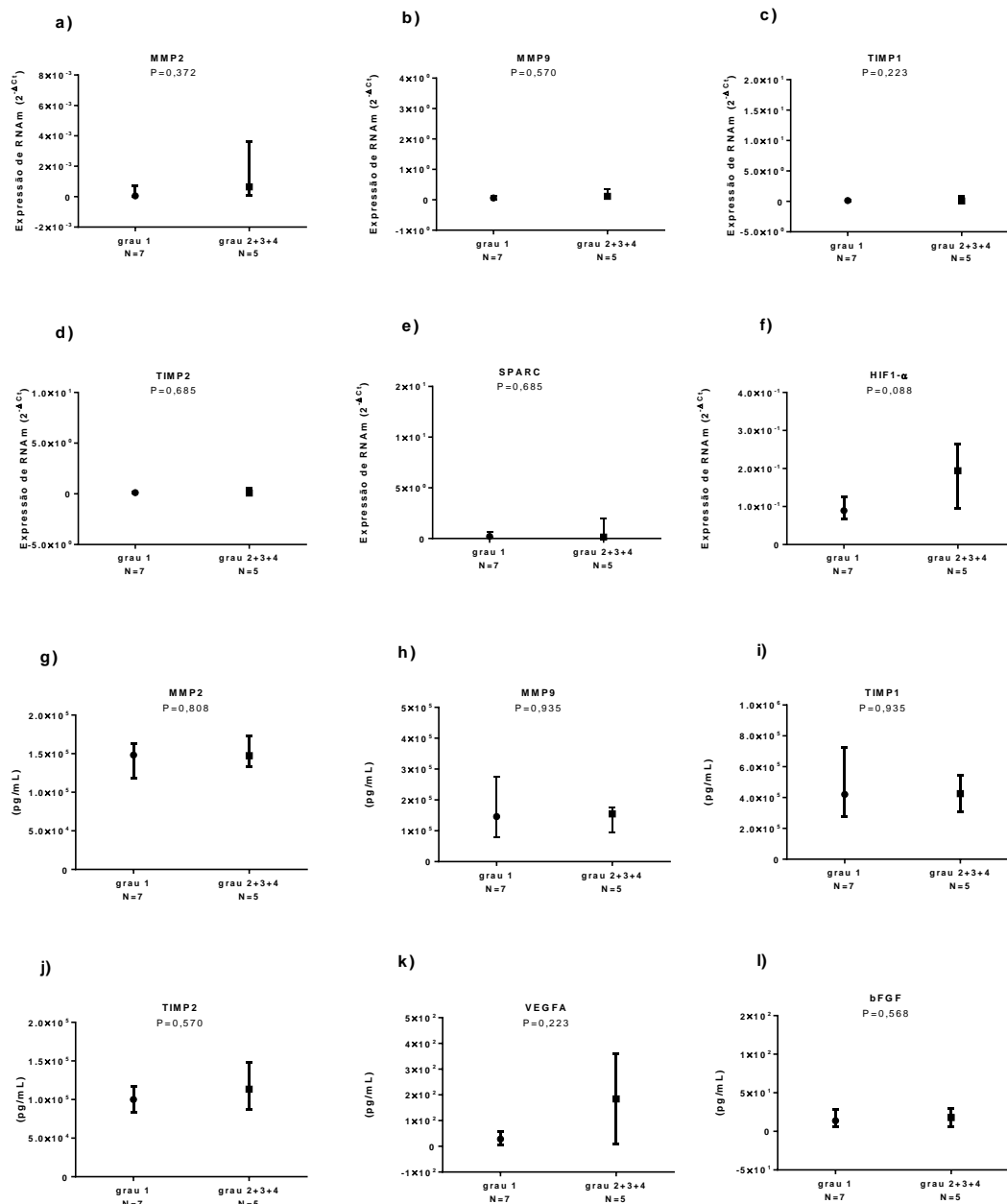


Figura 15. Expressão de RNAm de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* e *HIF1- α* e concentrações das proteínas *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC*, *HIF1- α* , *VEGFA* e *FGF*, segundo a expressão de CD34 em biópsias de medula óssea dos com MFTE

As Expressões de RNAm e concentrações dos analitos entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney

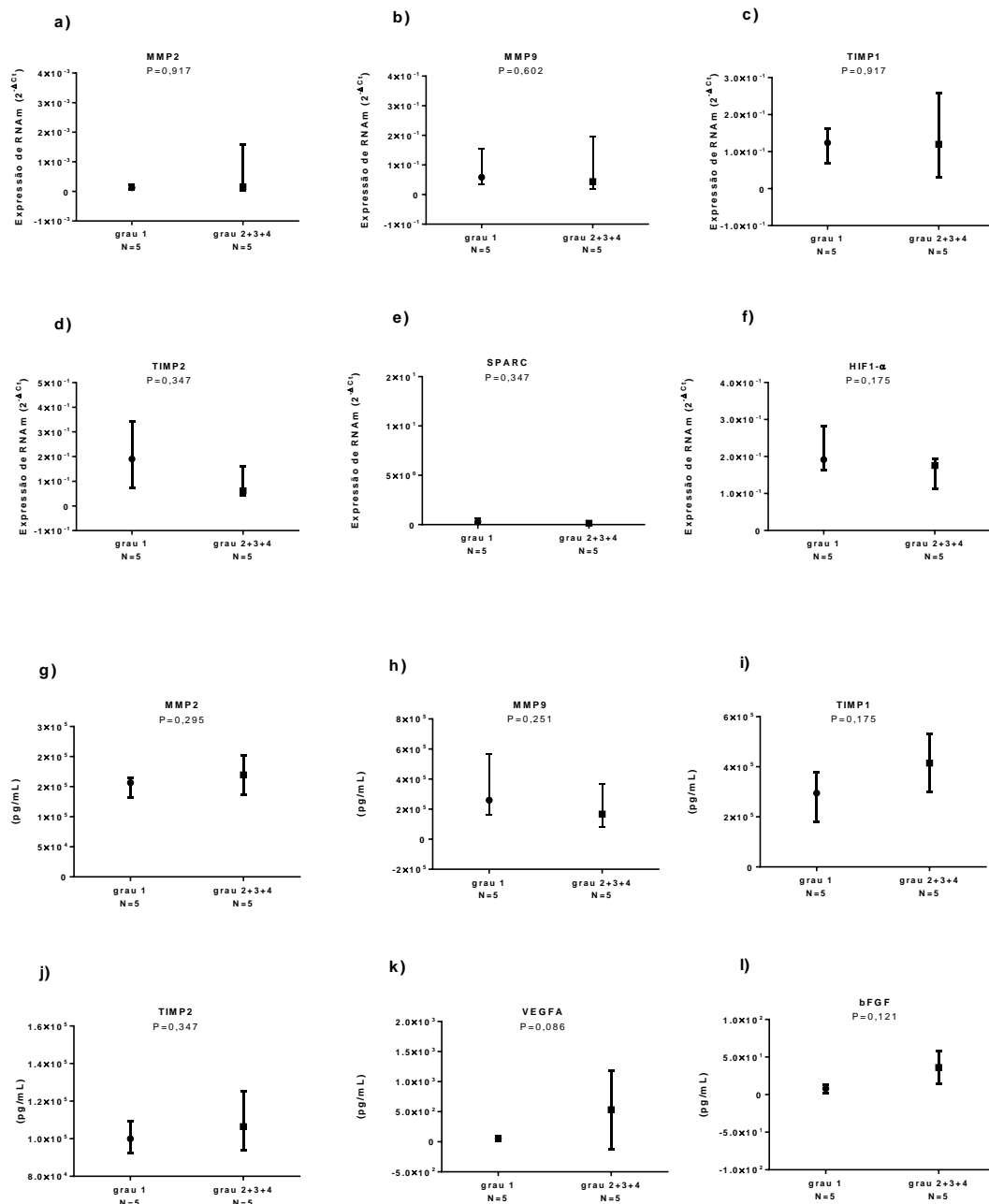


Figura 16. Expressão de RNAm de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* e *HIF1- α* e concentrações das proteínas *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *SPARC* *HIF1- α* , *VEGFA* e *FGF*, segundo a expressão de *CD34* em biópsias de medula óssea dos TE

As Expressões de RNAm e concentrações dos analitos entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney

5.6 Concentrações séricas de MMP2, MMP9, TIMP 1 e TIMP 2 e plasmáticas de VEGF e FGF em pacientes com MFP, MFPTe e TE segundo o *status* mutacional

A distribuição das mutações *CALR* entre os grupos de pacientes está apresentada na **Tabela 22**. Considerando apenas os pacientes negativos para as mutações $JAK2^{V617F}$ e $MPL^{W515K/L}$, foram encontradas mutações no gene *CALR* em 80,0% dos pacientes com MFP (N=8), 77,9% dos pacientes com MFPTe (N=7) e 11,1% dos pacientes com TE (N=2). As mutações no gene *CALR* mais frequentemente encontradas nos pacientes foram a mutação tipo 1 (p.L367fs*46), seguida pela mutação tipo 2 (p.K385fs*47). Havia 9 (31%) pacientes com mutação tipo 1 e 6 pacientes (20,6%) tipo 2, enquanto os demais exibiram os tipos 32 (p.K385fs*46) bem como uma mutação nova (1125delA). Os pacientes com TE não apresentaram mutação *CALR* do tipo 2.

Tabela 22. Frequências das mutações no gene *CALR* nos pacientes com MF, MFPTe e TE

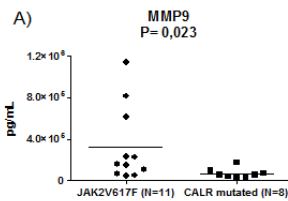
Mutação	Tipo da mutação	MFP (N=10)	MFPTe (N=9)	TE (N=9)	Total (N=29)
1092_1143del52	1	4 (40,0)	3 (33,4)	2 (22,2)	9 (31,0)
1154_1155insTTGTG	2	3 (30,0)	3 (33,4)	0	6 (20,6)
1153_1154AA>TGTC	32	0	1 (11,1)	0	1 (3,5)
1125delA*	Nova	1 (10,0)	0	0	1 (3,5)
Tipo selvagem	Nenhuma	2 (20,0)	2 (22,1)	7 (77,8)	12 (41,4)

*1125delA é uma mutação nova. MFP: mielofibrose primária, MFPTe: mielofibrose pós-trombocitemia essencial, MFPPV: TE: trombocitemia essencial. As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos e frequência entre parênteses

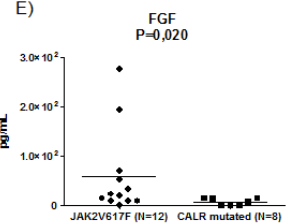
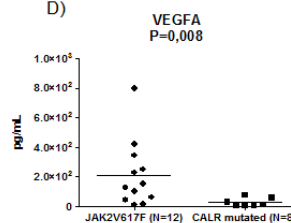
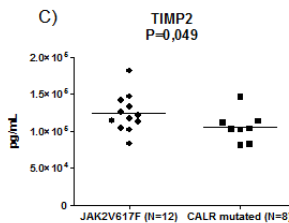
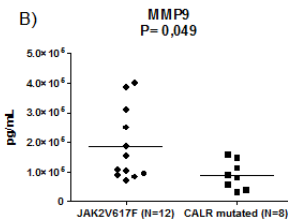
Pacientes com MFP $JAK2^{V617F}$ -positivos apresentaram maiores concentrações MMP9 comparados aos pacientes portadores de mutações na *CALR* (**Figura 17A**, $P=0,023$). Os pacientes com MFPTe $JAK2^{V617F}$ -positivos apresentaram maiores concentrações de MMP9, TIMP2, FGF e VEGF quando comparados aos *CALR* mutados (**Figura 17A, B, C D e E**; $P=0,049$, $P=0,049$, $P=0,008$, $P=0,020$, respectivamente). Considerando os pacientes com trombocitemia essencial, não foi possível comparar as concentrações das proteínas estudadas com os indivíduos *CALR* mutados devido ao pequeno número amostral (N=2). Desse modo, a análise foi feita comparando-se os $JAK2^{V617F}$ -positivos com os indivíduos

triplo-negativos, ou seja, indivíduos negativos para as mutações no gene *JAK2*, *CALR* e *cMPL*. Pacientes com TE *JAK2*^{V617F}-positivos apresentaram maiores concentrações de MMP2 e TIMP2 quando comparados aos triplo-negativos (**Figura 17F e G**; P=0,049 e P=0,020, respectivamente). Na **Figura 17** estão apresentadas apenas as análises que deram diferenças significantes (P<0,05).

Mielofibrose primária



Mielofibrose Pós-Trombocitemia essencial



Trombocitemia essencial

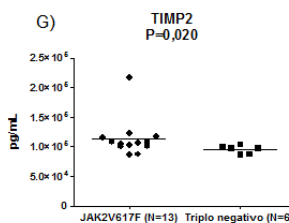
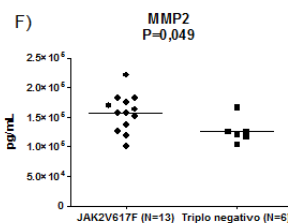


Figura 17. Concentração das proteínas MMP2, MMP9, TIMP2, VEGFA e FGF nos pacientes com MFP, MFPTe e TE segundo o status mutacional

Nota: Indivíduos triplo-negativos são aqueles que não apresentaram mutações nos genes *JAK2*, *CALR* e *cMPL*

Embora pacientes *JAK2*^{V617F} positivos tenham apresentado maiores concentrações de MMP2, MMP9, TIMP2, VEGFA e FGF (**Figura 17**), essas concentrações não foram correlacionadas à carga alélica de *JAK2*^{V617F} (**Tabela 23**, P>0,05).

Tabela 23. Correlações de Spearman entre concentrações plasmáticas de MMP2, MMP9, TIMP2, VEGFA e FGF e a carga alélica de $JAK2^{V617F}$ em pacientes com MFP, MFPTE e TE

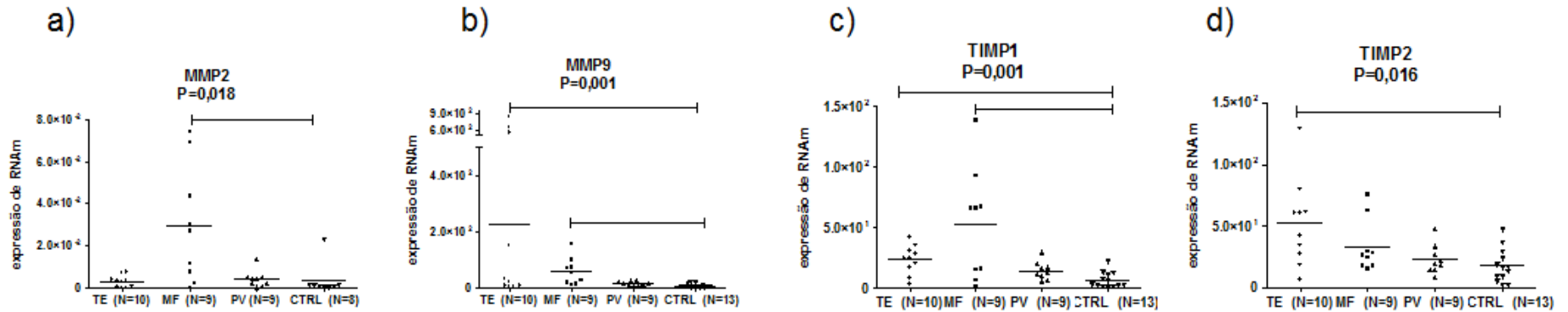
Grupo	MMP2	MMP9	TIMP2	VEGFA	FGF
MFP		r= 0,440			
		P= 0,175			
		N= 11			
MFTE		r= -0,820	r= 0,505	r= -0,434	r= -1,09
		P= 0,800	P= 0,940	P= 0,158	P= 0,737
		N= 12	N= 12	N= 12	N= 12
TE	r= 0,540		r= 0,329		
	P= 0,861		P= 0,273		
	N= 13		N= 13		

5.7 Expressão gênica de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e HIF1- α em granulócitos e plaquetas de pacientes com MF, TE, PV e controles saudáveis

A expressão das metaloproteinases e de seus inibidores está representada na **Figura 18** e de *HIF1- α* na **Figura 19**.

Os granulócitos de pacientes com TE apresentaram maior expressão de MMP9, TIMP1 e TIMP2 (**Figura 18 B, C e D**) do que os controles, enquanto somente a MMP9 estava aumentada nas plaquetas destes pacientes (**Figura 18F**). Os pacientes com MF apresentaram maior expressão de MMP2, MMP9 e TIMP1 nos granulócitos (**Figura 18 A, B e C**) e MMP2 e MMP9 (**Figura 18, E e F**) nas plaquetas quando comparados aos controles. Pacientes com PV não apresentaram diferenças nas expressões dos genes em relação ao controle.

Granulócitos



Plaquetas

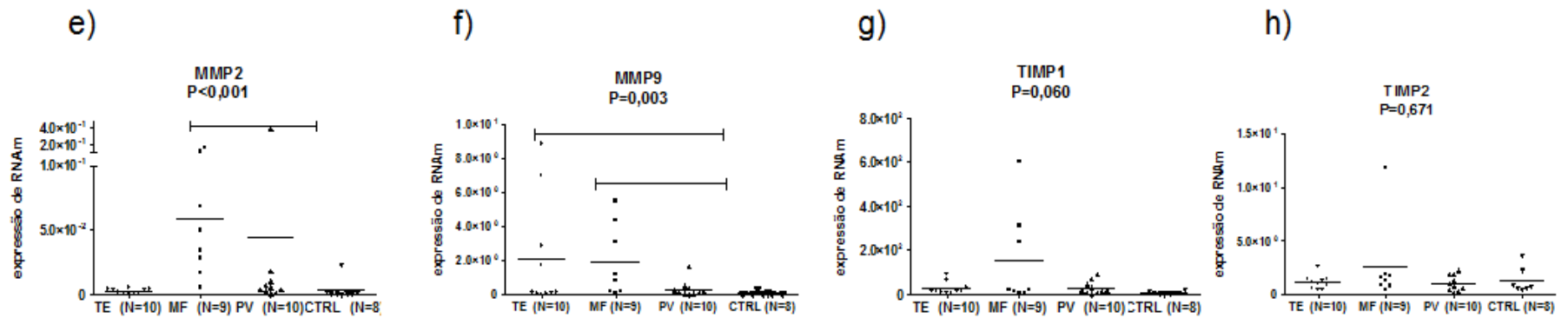


Figura 18. Expressão de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 em granulócitos e plaquetas de pacientes com Trombocitemia essencial, Mielofibrose, Policitemia vera e controles

A expressão do mRNA foi medida por PCR em tempo real e normalizada com os genes de referência *HPRT1* e *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As expressões de RNAm entre os grupos foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis

A expressão de HIF1- α foi maior em granulócitos e plaquetas de pacientes com TE e PV comparados aos controles (**Figura 19, B, C, E, e F**).

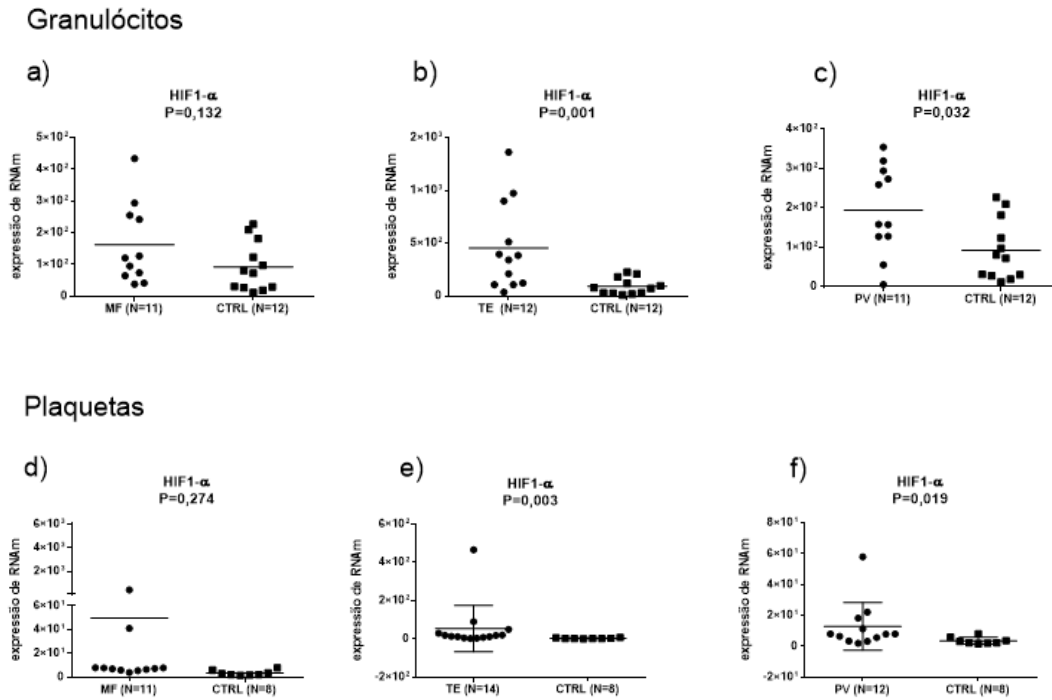


Figura 19. Expressão de *HIF1- α* em granulócitos e plaquetas de pacientes com MF, TE, PV e controles saudáveis

A expressão do mRNA foi medida por PCR em tempo real e normalizada com os genes de referência *HPRT1* e *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As expressões de RNAm de *HIF1- α* entre os dois grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney

5.8 Análise da expressão gênica de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 em colônias BFU-E submetidas a hipóxia e normóxia

Não foi encontrada diferença nas expressões de RNAm de MMP9, TIMP1 e TIMP2 entre células de submetidas a hipóxia e normóxia ($P > 0,05$; **Figura 20**). A expressão de MMP2 não foi detectada devido a este gene ser pouco expresso nesta população e o material de análise ser escasso (apenas cinco colônias por paciente).

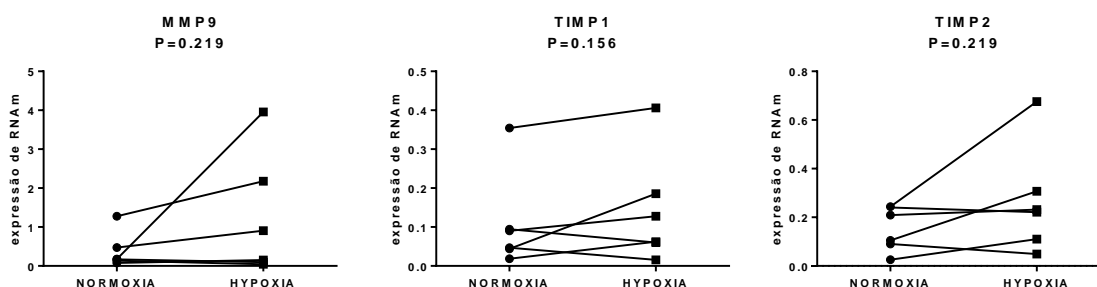


Figura 20. Expressão de MMP9, TIMP1 e TIMP2 em BFU-E submetidas a hipóxia e normóxia

A expressão do mRNA foi medida por PCR em tempo real e normalizada com o gene de referência GUSP. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As expressões de RNAm entre os dois grupos foram comparadas pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas. ns: não significante

5.9 Análise da expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 e HIF1- α em medula óssea de camundongos C57Bl/6

Foi observado aumento nas expressões dos genes MMP2 e TIMP1 no grupo de camundongos C57Bl/6 submetidos à hipóxia por 4 dias (**Figura 21**). Os outros genes *MMP9*, *TIMP2* e *HIF1- α* foram mais expressos, porém não houve diferença significativa.

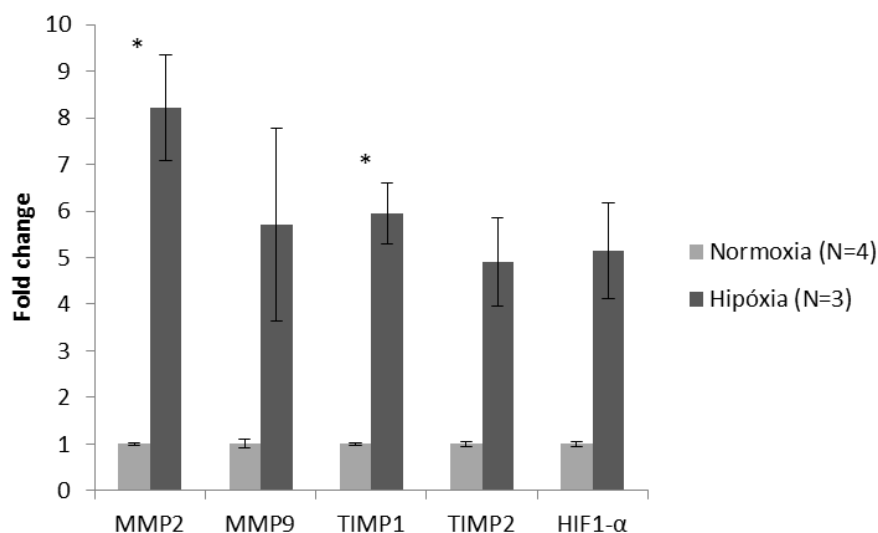


Figura 21. Expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *HIF1-α* em amostras de medula de óssea de camundongos C57Bl/6 submetidos a 4 dias de hipóxia comparados aos camundongos em normóxia

Valores estão representados como média e desvio padrão relativo do *fold change*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ e o gene de referência utilizado foi o *18s*. As médias foram comparadas utilizando o teste t de student. * representa $P < 0,05$

5.10 Análise da expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *HIF1-α* em células LSK da medula óssea de camundongos C57Bl/6 submetidos a 10 dias de hipóxia

Diferente da expressão gênica em amostras de medula óssea total, as linhagens apresentaram diminuição na expressão dos genes *HK1* e *VEGFA*. Vale ressaltar que o tempo de exposição à hipóxia neste grupo foi de 10 dias e não 4 dias conforme experimento anterior. As células duplo-negativas e linhagem positiva do grupo submetido à hipóxia apresentaram maiores expressões de *MMP9* e *TIMP2* respectivamente ($P < 0,05$; **Figura 22C e D**).

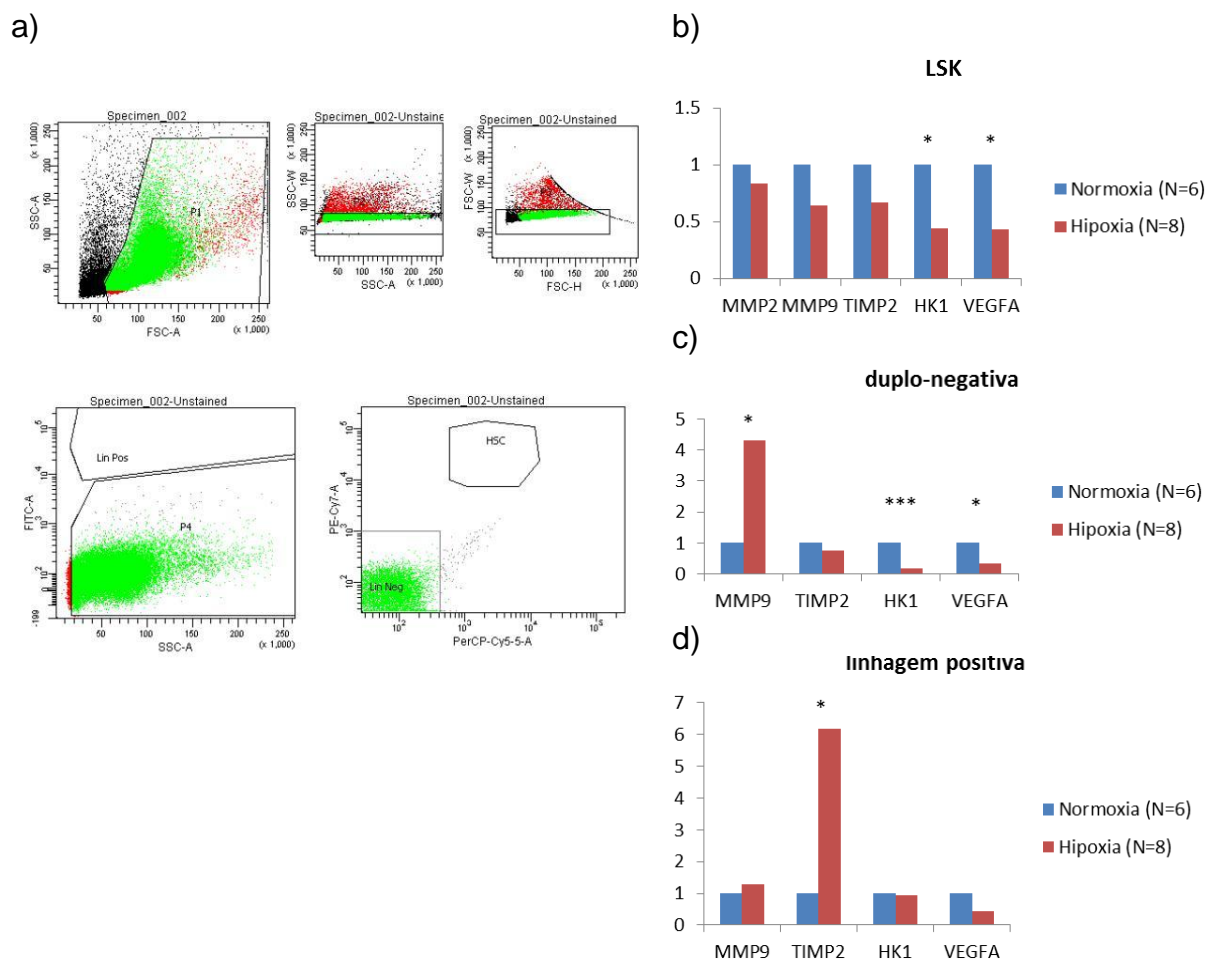


Figura 22. Expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e HIF1- α em amostras de medula de óssea de camundongos C57Bl/6 submetidos a 10 dias de hipóxia comparados aos camundongos em normóxia. A) Separação das células LSK da medula óssea; B) células LSK; C) Células Duplo-negativas (Ska- e cKit-), D) Células Linhagem positiva

Valores estão representados como média e desvio padrão relativo do *fold change*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ e o gene de referência utilizado foi o 18s. As médias foram comparadas utilizando o teste t de Student. * P<0,05 e *** P<0,001

5.11 Análise da expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *HK1* em embriões de camundongos selvagens (WT) e nocaute para *HIF1- α*

As expressões dos genes *MMP9* e *TIMP2* nos camundongos *HIF1- α ^(-/-)* foram aproximadamente três vezes maiores do que as observadas nos camundongos selvagens. A menor expressão de *HK1* confirma o silenciamento de *HIF1- α* , uma vez que se encontra a jusante nesta via de sinalização (**Figura 23**).

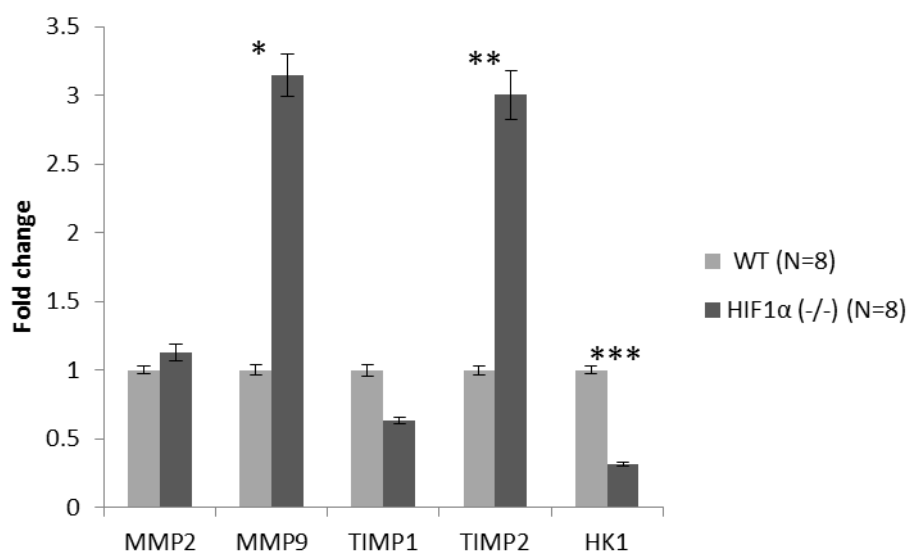


Figura 23. Expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *HK1* em embriões de camundongos selvagens (WT) e nocautes para *HIF1- α*

Valores estão representados como média e desvio padrão relativo do *fold change*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ e o gene de referência utilizado foi o *18s*. As médias da expressão foram comparadas utilizando o teste t de student. * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$

5.12 Análise da expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *HK1* em camundongo *VHL*^(-/-) e selvagem (WT)

As expressões de todos os genes estudados em camundongos Chuvash *VHL*^(-/-) foram maiores em relação ao grupo controle. A expressão aumentada de *HK1* confirmou a ativação da via HIF1- α devido à perda de função do gene *VHL*, que é um mediador da degradação proteossômica de HIF-1 α hidroxilado (**Figura 24**).

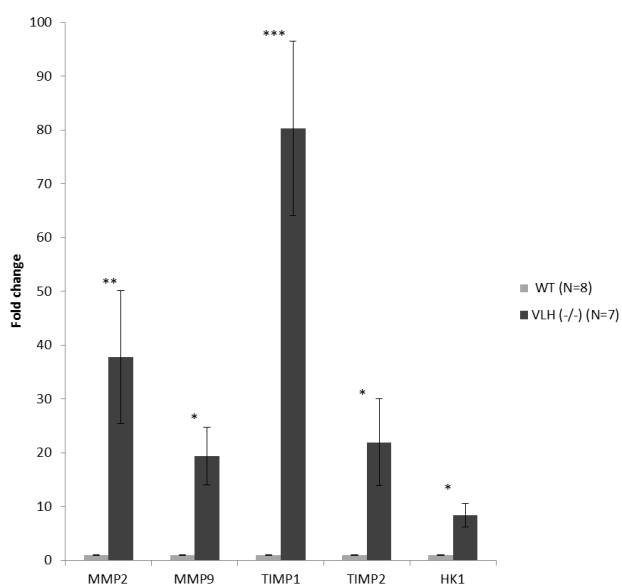


Figura 24. Expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *HK1* em fígado de camundongo Chuvash *VHL*^(-/-) e selvagem (WT)

Valores estão representados como média e desvio padrão relativo do *fold change*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ e o gene de referência utilizado foi o *18s*. As médias foram comparadas utilizando o teste t de student. * P<0,05. ** P<0,01. *** P<0,001

6 DISCUSSÃO

A descoberta da mutação $JAK2^{V617F}$ no início de 2005 (Baxter *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005), seguida pela descrição de mutações no exon 12 do gene $JAK2$ e mutações no gene MPL (Pikman *et al.*, 2006), facilitou o diagnóstico e também agregou conhecimento à patogênese das NMPs $BCR-ABL1$ negativas (Goldman *et al.*, 2009). Entretanto, uma proporção significativa dos pacientes com MF e TE (~40%) não apresentam essas mutações, o que se tornou uma grande incógnita na era pós- $JAK2$. A descoberta de mutações no gene $CALR$ na grande maioria dos pacientes $JAK2^{V617F}$ e MPL negativos elucidou grande parte dessa questão, mas seu papel ainda continua incerto (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013). Estes eventos ainda não explicam integralmente a fisiopatologia dessas doenças.

A angiogênese possui grande importância nas neoplasias em geral, uma vez que contribui para a disseminação do tumor. É um processo altamente regulado que consiste na formação de novos vasos sanguíneos, e uma de suas etapas inclui a degradação da matriz extracelular pelas MMPs (Bonnans, Chou e Werb, 2014). Essas proteases foram associadas aos processos de progressão, migração, invasão, metástase de tumores e angiogênese (Kessenbrock, Plaks e Werb, 2010). A maioria dos estudos sobre o papel das MMPs em neoplasias hematológicas tem sido focada nos seus efeitos sobre o comportamento de invasão e transmigração em diferentes tipos de células leucêmicas. Entretanto, elas também podem participar do processo angiogênico na medula óssea, aumentando a sobrevivência das células leucêmicas por meio da liberação de fatores de crescimento, os quais promovem a progressão tumoral (Chaudhary *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o presente trabalho se propôs um estudo em pacientes com MF e TE considerando o *status* mutacional, e outro em modelos animais $HIF1-\alpha^{(-/-)}$ e $VHL^{(-/-)}$ para investigar a participação de HIF na regulação das MMPs.

Em relação às características clínicas dos pacientes, a perda de peso é um sintoma constitucional bem descrito das NMPs em geral, e aproximadamente 13% dos pacientes apresentam emagrecimento involuntário durante o curso da doença (Mesa *et al.*, 2007). Corroborando com dados da literatura, os pacientes com MFP e

MFPTE incluídos no presente estudo apresentaram menor IMC do que seus respectivos controles.

O maior número de plaquetas nos pacientes com TE comparado aos seus controles era esperado, devido à hiperplasia da medula óssea com proliferação excessiva de megacariócitos e consequente plaquetose acentuada, que são características da própria doença (Fialkow *et al.*, 1981)(Martyré *et al.*, 1997).

Na TE, a trombose nas grandes artérias é a maior causa de mortalidade, podendo causar danos neurológicos e cardíacos graves e perda das habilidades motoras. Como a maioria dos pacientes estava sendo tratada, era esperado que o risco de desenvolvimento de trombose fosse reduzido ou próximo ao de indivíduos controle. Apesar de os pacientes com TE não terem apresentado maior frequência de eventos trombóticos do que seus controles, foi observada maior frequência de hipertensão arterial nesses pacientes, que é um fator de risco importante para o desenvolvimento de trombose, podendo predispor a eventos vasculares oclusivos envolvendo a circulação arterial periférica (Brière, 2007).

Os maiores reguladores da atividade das MMPs são as TIMPs. Elas inibem as MMPs numa razão molar 1:1 (Rucci, Sanità e Angelucci, 2011). Outra proteína que pode interagir com as MMPs é a SPARC, uma proteína matricelular, capaz de modular a interação célula-matriz extracelular e influenciar a resposta a fatores de crescimento como o VEGFA, bFGF e TGF- β 1 e, por conseguinte, contribuir para os processos fisiológicos que envolvem a neovascularização (Rivera, Bradshaw e Brekken, 2011).

Existem poucos estudos que avaliaram o perfil das gelatinases em pacientes com NMPs BCR-ABL1 negativas, sendo que nestes, o principal foco é a associação com o desenvolvimento da doença ou o processo de fibrose. Concentrações elevadas de MMP9 foram encontradas em pacientes com PV quando comparados ao grupo controle. Além disso, nesse mesmo estudo, pacientes com MF apresentaram maior razão TIMP1/MMP9 quando comparados ao controle (Jensen *et al.*, 2003). Esse achado sugere que o desequilíbrio da homeostase extracelular pode levar ao aumento da deposição de matriz e, conseqüentemente, à fibrose. Contudo, nenhum marcador de fibrose medular foi avaliado nesses pacientes. Ademais, outros autores relataram que concentrações elevadas de TIMPs, mas não de MMPs, foram associadas a TE e PV (Wang *et al.*, 2002).

Desconhecemos outro estudo que tenha avaliado a expressão de MMPs e de TIMPs e as tenha relacionado com marcadores de angiogênese em pacientes com NMPs. No entanto, nenhuma das proteínas estudadas foi associada à densidade microvascular da medula óssea nos três grupos estudados (MFP, MFPTE e TE).

Em nosso estudo, foi encontrada maior expressão de RNAm de *MMP2* e *SPARC* em pacientes com MFP; *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *SPARC* em pacientes com MFTE; e *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *HIF1- α* e *SPARC* nos pacientes com TE quando comparados aos seus controles. No entanto, as concentrações dessas proteínas não foram correlacionadas à expressão gênica, sendo que as concentrações das MMPs foram similares nos grupos de pacientes e seus controles. Esta discrepância entre a expressão de RNAm e de proteína sugere que algum mecanismo de regulação pós-transcricional possa estar envolvido neste processo. Tem sido descrito que a regulação da expressão das MMPs ocorre a nível transcricional, seja pela ligação de fatores de transcrição ou por mecanismos epigenéticos (Yan e Boyd, 2007). No entanto, há hipóteses de que a expressão pode ser regulada a nível pós-transcricional através da *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP ou FBP2), que promove o recrutamento do RNAm nos exossomos (Knapinska *et al.*, 2005), ou pelo recrutamento dependente da sequência 3'UTR do RNAm aos ribossomos ou polissomos onde o transcrito é traduzido (Fahling *et al.*, 2005).

Considerando que, no presente estudo, as concentrações séricas das MMPs foram similares entre pacientes com NMPs e indivíduos controles, um parâmetro interessante a ser avaliado seria a atividade dessas proteases entre os grupos de participantes do estudo. No entanto, não foi possível avaliar a atividade das MMPs no presente estudo, devido a dificuldades na aplicação do método proposto para esta análise.

No presente trabalho, os pacientes com MFP apresentaram maior concentração sérica de TIMP1 em comparação aos controles. Além disso, o aumento da concentração de TIMP1 foi associado à diminuição da concentração de MMP9. Tal associação não foi observada nos indivíduos controle, sugerindo que na MF possa haver um mecanismo de *feedback* negativo no controle da expressão de MMP9.

Altas concentrações de TIMP1 e TIMP2 foram encontradas nos pacientes com MFP, MFTE e TE. Nossos dados de TIMP1 corroboram com os encontrados por dois outros grupos, que encontraram concentrações elevadas de TIMP1 em pacientes com PV, MF e TE (Wang *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2003).

Há relatos de que, além de atuar como inibidores da atividade de MMP2 e 9, TIMP1 e 2 são capazes de agir como fatores de crescimento, estimulando a proliferação de precursores eritroides e fibroblastos de medula óssea (Stetler-Stevenson, Bersch e Golde, 1992; Chesler *et al.*, 1995; Murate *et al.*, 1997). De fato, em modelos de regressão linear realizados em nosso estudo, as concentrações de TIMP2 foram associadas positivamente as concentrações de bFGF na MFPTTE.

Com exceção dos pacientes com MFPPV, todos os grupos de pacientes estudados mostraram maior expressão de RNAm de *SPARC* quando comparados aos seus controles, sugerindo que a expressão deste gene está associada à doença. Tanto nos pacientes com MFPTTE quanto seus controles, o aumento da concentração de *SPARC* foi associado à diminuição de 2 vezes da concentração de bFGF, um marcador plasmático de angiogênese. Não existe consenso sobre o efeito de *SPARC*, ora descrito como pró-angiogênico e ora descrito como anti-angiogênico (Rivera, Bradshaw e Brekken, 2011). É descrito que *SPARC* pode interagir direta ou indiretamente com os fatores angiogênicos e, por sua vez, impactar no processo de formação de novos vasos (Chlenski e Cohn, 2010). Outro dado interessante do presente estudo foi que os pacientes com MFP com risco baixo e risco intermediário na classificação DIPSS-plus apresentaram menor expressão de RNAm de *SPARC*.

Foi demonstrado, por marcação imuno-histoquímica em biópsias de medula óssea de pacientes com mieloproliferação clonal, que a expressão de *SPARC* está correlacionada positivamente com DMV, com a fibrose medular e pior prognóstico (Tripodo *et al.*, 2012). Tais achados *in vivo* foram extrapolados para confirmação em modelo animal, que demonstrou que o aumento induzido da expressão de *SPARC* está associado às alterações fibróticas no estroma medular que ocorrem em decorrência da mieloproliferação. Entretanto, nenhuma associação com as moléculas envolvidas no processo angiogênico foi realizada. No presente estudo, a expressão de RNAm e a concentração de *SPARC* não foram associadas à densidade microvascular nos pacientes com NMPs.

Nos modelos de regressão linear multivariada, SPARC não foi associada à expressão de MMP9 e de MMP2 nos três grupos estudados. Tal achado é discordante do encontrado na literatura, no qual foi observada correlação direta entre a expressão de SPARC com as MMPs 2 e 9 (Li *et al.*, 2013). Entretanto, foi descrito que células que superexpressam SPARC (Daoy-SP) apresentam menor expressão de MMP9 e VEGFA (Bhoopathi *et al.*, 2010) .

Nossos dados também demonstraram que as concentrações plasmáticas de bFGF estavam aumentadas em todos os grupos de pacientes incluídos nesse estudo em relação aos grupos controles. Estes achados eram esperados, visto que pacientes com NMPs apresentam maior intensidade de angiogênese em relação a indivíduos saudáveis e pacientes com outras NMPs (Di Raimondo *et al.*, 2001). Outro estudo que avaliou 25 controles saudáveis e 74 pacientes com NMPs (8 PV, 41 TE e 25 MF), além de correlacionar a expressão de VEGF na medula à densidade microvascular em pacientes com NMPs, também demonstrou que as concentrações de VEGFA séricas estão significativamente relacionadas à marcação imuno-histoquímica de VEGF na medula em pacientes com NMPs, o que nos permite sugerir essa relação com a angiogênese no sangue periférico (Panteli *et al.*, 2004). Nossos dados são discordantes dos apresentados pelos autores, pois não foi encontrada associação entre a concentração de VEGF e FGF e a densidade microvascular. Tal fato poderia ser explicado pelo número reduzido de pacientes com biópsia de medula óssea disponível no presente estudo.

As maiores concentrações plasmáticas de bFGF encontradas nos pacientes em relação aos seus controles destacam a importância do papel dessa proteína nas NMPs. Maiores concentrações de VEGFA foram encontradas nos pacientes com TE. No entanto, as concentrações de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC não foram associadas a esta variável dependente nos modelos de regressão linear multivariada.

As frequências da presença da mutação $JAK2^{V617F}$ observadas nesse estudo (52,4% na MFP, 57,1% na MFPTE e 54,2% na TE) são semelhantes às descritas em populações brasileiras (Monte-Mór *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2013).

A carga alélica da mutação $JAK2^{V617F}$ é uma medida variável, determinada pela frequência dos eventos de recombinação mitótica e da expansão de clones

JAK2^{V617F}. A variabilidade da carga alélica é em parte responsável pelos fenótipos clínicos distintos vistos nas NMPs (Stein *et al.*, 2010). Pacientes com TE apresentam os menores valores de carga alélica e aqueles com PV e MFP apresentam valores intermediários (Moliterno *et al.*, 2006; Passamonti *et al.*, 2006; Antonioli *et al.*, 2008). Apesar de essas associações serem consistentemente observadas na prática clínica, a carga alélica não é um parâmetro prognóstico considerado para intervenções terapêuticas (Passamonti e Rumi, 2009).

Após dois estudos terem identificado as mutações no éxon 9 no gene da *CALR* em grande parte dos pacientes com TE e MF negativos para as mutações nos genes *JAK2* e *MPL*, assumiu-se que essas mutações possuem importante papel na patogênese dessas doenças (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013). Consequentemente, devido a essa importância, a análise de mutações em *CALR* foi integrada aos critérios diagnósticos da Organização Mundial da Saúde para as NMPs (Arber, *et al.*, 2016). A identificação dessas mutações pode ter implicações para novas estratificações de risco, conduta e prognóstico (Andrikovics *et al.*, 2014; Rotunno *et al.*, 2014; Rumi *et al.*, 2014; Tefferi, Guglielmelli, *et al.*, 2014; Tefferi, Lasho, *et al.*, 2014). Desse modo, optou-se por incluir a avaliação dessa mutação no presente estudo.

As frequências das mutações *CALR* nos pacientes com NMPs desse estudo (27,3%) confirmam achados anteriores em pacientes europeus (20-25%) (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2014). Essas mutações estavam presentes em 74% (Tefferi, Lasho, Finke, Knudson, *et al.*, 2014) e 88% (Klampfl *et al.*, 2013) dos pacientes com MFP *JAK2*^{V617F} negativos, enquanto no presente estudo a frequência encontrada foi de 80%. Por outro lado, estudos com pacientes chineses (Qiao *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014) e japoneses (Shirane *et al.*, 2015) mostraram menores frequências de mutações em *CALR*. É possível que diferenças étnicas e ambientais possam influenciar as frequências das mutações em *CALR* nas diversas populações.

No presente estudo, foi mostrado que pacientes com MFP e MFTE com mutação no gene *CALR* possuem menores concentrações de MMP9, TIMP2, VEGF e FGF quando comparados aos *JAK2*^{V617F} positivos. Além disso, pacientes com TE e triplo negativos apresentaram menores concentrações de MMP2 e TIMP2. As mutações no gene *CALR* consistem em inserções ou deleções que resultam em modificação na parte C-terminal da proteína. Os últimos 4 aminoácidos [KDEL], que

contém o sinal para a retenção no retículo endoplasmático, se tornam positivamente carregados, resultando em perda da função da proteína e consequente errônea localização celular (Klampfl *et al.*, 2013). A menor concentração encontrada nos pacientes pode em parte ser explicada por esta alteração na função de CALR que poderia afetar o transporte dessas proteínas para o meio extracelular. Com base nestes resultados obtidos nos pacientes $JAK2^{V617F}$ positivos, foi iniciado um estudo durante o período sanduíche no exterior para verificar se a mutação $JAK2^{V617F}$ pode regular a expressão das MMPs. Células $JAK2^{V617F}$ positivas HEL 92.1.7 e SET-2 estão sendo tratadas com inibidor da via JAK-STAT comercial para testar esta hipótese.

A respeito das frequências encontradas para as mutações no gene *CALR*, nossos dados são concordantes com os estudos anteriormente mencionados. A respeito da nova mutação 1125delA encontrada nesse estudo, as análises de bioinformática demonstraram que essa mutação causa erro na leitura dos códons e consequentes alterações na estrutura secundária da proteína, levando a conformação de alfa-hélice na região mutada.

No geral, pacientes com mutação *CALR* tem melhor sobrevida quando comparados àqueles com $JAK2^{V617F}$ (Tefferi, Lasho, *et al.*, 2014). Foi observado que a mutação $JAK2^{V617F}$ é mais clonal que as mutações da *CALR*, o que sugere que pacientes portadores da $JAK2^{V617F}$ tenham pior prognóstico e curso maligno da doença quando comparados aos *CALR* mutados (Swierczek *et al.*, 2015). Nessa pesquisa, detectou-se menor frequência de esplenomegalia em pacientes com TE portadores de mutação *CALR* em comparação aos $JAK2^{V617F}$ positivos, assim como demonstrado por outro grupo Também demonstrou-se que mutações *CALR* associaram-se a menores contagens de hemácias, concentrações de hemoglobina e hematócrito em pacientes com MFP, como previamente reportado em outros grupos (Rotunno *et al.*, 2014; Tefferi, Lasho, *et al.*, 2014; Shirane *et al.*, 2015).

Os pacientes portadores de mutações no gene *CALR* tem demonstrado maior sobrevida e melhor prognóstico em comparação aos $JAK2^{V617F}$ e triplo-negativos (Tefferi, Lasho, *et al.*, 2014).

Pacientes com PV, MF e TE $JAK2^{V617F}$ positivos mostraram altas razões de TIMP/MMP; contudo, os autores não avaliaram a carga alélica da mutação $JAK2^{V617F}$ (*allele burden*) nesses pacientes (Vadikolia *et al.*, 2011). Nosso estudo mostrou que

as altas concentrações de proteínas encontradas nos pacientes *JAK2*^{V617F} positivos não foram associadas à carga alélica desta mutação.

Outro dado interessante obtido no presente estudo foi que pacientes com TE apresentaram maior expressão de *HIF1-α* quando comparados aos controles. Esse achado nos levou à hipótese de que esse gene, uma vez que possui um papel importante na regulação da angiogênese, poderia controlar a expressão das MMPs e impactar a progressão e o desfecho clínico das NMPs. Foram então conduzidos estudos em pacientes para confirmação do dado encontrado no Brasil, estudos *in vitro* e em camundongos *HIF1-α*^(-/-) e *VHL*^(-/-) para testar a nossa hipótese.

Os dados de expressão gênica de *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* em granulócitos e plaquetas dos pacientes norte-americanos com MF e TE incluídos neste estudo são concordantes com os dados de expressão em leucócitos totais dos pacientes brasileiros. Pacientes com TE e PV apresentaram maior expressão de *HIF1-α* comparados ao grupo controle. Na MF, não foi observada diferença na expressão deste gene. Devido a *HIF1-α* estar aumentado nestas duas doenças que podem evoluir para mielofibrose, sugere-se a hipótese de que esse fator possa estar envolvido na possível progressão destas duas doenças. Foi demonstrado que pacientes com PV possuem maior expressão de genes regulados pelo HIF tais como: *TFRC*, *SLC2A1*, *HK1*, *PDK1*, *VEGF*, e *BNIP3* (Kapralova *et al.*, 2014). Esse aumento da expressão de genes regulados por HIF caracterizam em partes o chamado efeito de Warburg, mecanismo de adaptação no qual as células tumorais utilizam a glicólise para produção de energia devido à ocorrência de um microambiente hipóxico (Prchal, 2012). Como a PV e a TE, diferente da MF, possuem hiperplasticidade na medula óssea sugere-se o aumento da expressão de HIF nestes pacientes possa ocorrer em detrimento ao ambiente mais hipóxico na medula óssea.

A expressão dos genes *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* em colônias BFU-E de pacientes expostos a baixas tensões de oxigênio não foram diferentes das colônias em condições de normóxia, provavelmente devido ao pequeno número amostral (apenas 5 pacientes). Porém, alguns pacientes apresentaram tendência ao aumento da expressão desses genes.

Camundongos C57Bl/6 submetidos à hipóxia por quatro dias apresentaram aumento nas expressões dos genes *MMP2* e *TIMP1*. Tal dado nos levou a investigar se a expressão destes genes era diferente em células LSK da medula óssea (Lin-, Sca+, cKit-). Os resultados obtidos foram diferentes do esperado, uma vez que, os genes regulados por HIF (HK1 e VEGFA) estavam diminuídos nos camundongos submetidos à hipóxia por 10 dias em relação ao controle. Essa observação pode ter sido causada devido ao maior tempo de exposição desses animais às baixas tensões de oxigênio, o que pode ter levado a um mecanismo adaptativo onde as expressões dos genes regulados por HIF decaem (Song *et al.*, 2015). Interessantemente, em condições de hipóxia, as expressões de RNAm de *MMP9* nas células duplo-negativas e de *TIMP1* em células de linhagem positiva foram maiores em relação ao controle.

Nossa hipótese era de que a expressão das MMPs estivesse diminuída nos embriões de camundongos HIF1- α ^(-/-); entretanto, os resultados foram contrários ao esperado. Esse resultado pode ter sido influenciado pelo modelo animal escolhido, uma vez que as MMPs são as principais responsáveis pelo remodelamento tecidual durante eventos fisiológicos como a embriogênese e organogênese (Handorf *et al.*, 2015).

VHL é parte de um complexo da ubiquitina ligase. Sua deleção resulta no acúmulo de HIF, uma vez que este não sofre a degradação no proteassomo (Semenza, 2009). Nos camundongos VHL^(-/-), os genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* estavam superexpressos, evidenciando que HIF é capaz de modular a expressão de MMPs e TIMPs. Estudos *in vitro* estão em andamento na Universidade de Utah, UT, EUA para confirmar estes achados. Células *JAK2*^{V617F} positivas HEL 92.1.7 e SET-2 estão sendo tratadas com DMOG (que aumenta a expressão de HIF1- α) e digoxina (que inibe a produção de HIF1- α) no intuito de verificar se HIF1- α pode modular a expressão das MMPs e TIMPs nessas células.

7 CONCLUSÃO

- Os resultados do presente estudo sugerem que a expressão elevada de SPARC e bFGF está associada às NMPs.
- Concentrações elevadas de proteínas envolvidas na angiogênese (MMP2, MMP9, TIMP2, VEGF e bFGF) sugerem um pior prognóstico MFP, MFPTE e TE *JAK2*^{V617F} positivos sugerem uma possível contribuição para o prognóstico e sobrevida dos pacientes.
- *HIF1-α* está diferencialmente expresso em TE e PV, sugerindo um importante papel deste gene na regulação da expressão das MMPs.
- Maior expressão de RNAm de *SPARC* e maior concentração de TIMP1 estão associadas ao grupo de menor risco da classificação DIPSS-plus, o que sugere associação da expressão dessas proteínas ao melhor desfecho clínico na MFP.
- As expressões de RNAm de MMP2, MMP9, SPARC, TIMP1, TIMP2 e HIF1-α, não estão associadas à DMV.
- A hipótese de que HIF pode regular as MMPs e TIMPs foi confirmada nos camundongos submetidos à hipóxia e em camundongos *VHL*^(-/-). Contudo, embriões *HIF1-α*^(-/-) não foram considerados um bom modelo para este estudo devido ao envolvimento das MMPs na embriogênese/organogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, O. et al. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 25, n. 7, p. 1219-20, Jul 2011.

ALONCI, A. et al. Evaluation of circulating endothelial cells, VEGF and VEGFR2 serum levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. **Hematol Oncol**, v. 26, n. 4, p. 235-9, Dec 2008.

ALSHEMMARI, S. H. et al. JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms. **Ann Hematol**, Dec 2013.

ALVAREZ-LARRÁN, A. et al. Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. **Ann Hematol**, v. 93, n. 12, p. 2037-43, Dec 2014.

ANDRIKOVICS, H. et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. **Haematologica**, v. 99, n. 7, p. 1184-90, Jul 2014.

ANG, S. O. et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. **Nat Genet**, v. 32, n. 4, p. 614-21, Dec 2002.

ARBER D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**. v. 127, n 19 p 2391-405 May, 2016.

ARNOLD, S. A. et al. Losartan slows pancreatic tumor progression and extends survival of SPARC-null mice by abrogating aberrant TGF β activation. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31384, 2012.

ARUCH, D.; MASCARENHAS, J. Contemporary approach to essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Curr Opin Hematol**, Dec 2015.

BABON, J. J. et al. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. **Biochem J**, v. 462, n. 1, p. 1-13, Aug 2014.

BARBUI, T. et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 6, p. 761-70, Feb 2011.

BAROSI, G.; HOFFMAN, R. Idiopathic myelofibrosis. **Semin Hematol**, v. 42, n. 4, p. 248-58, Oct 2005.

BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1825, n. 1, p. 29-36, Jan 2012.

BAXTER, E. J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1054-61, 2005 Mar 19-25 2005.

BHOOPATHI, P. et al. The role of MMP-9 in the anti-angiogenic effect of secreted protein acidic and rich in cysteine. **Br J Cancer**, v. 102, n. 3, p. 530-40, Feb 2010.

BITTENCOURT, R. I. et al. Trombocitose essencial: o que é essencial saber. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 162-170, 2010.

BJÖRKHOLM, M. et al. Treatment-related risk factors for transformation to acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in myeloproliferative neoplasms. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 17, p. 2410-5, Jun 2011.

BOCK, O. et al. Bone morphogenetic proteins are overexpressed in the bone marrow of primary myelofibrosis and are apparently induced by fibrogenic cytokines. **Am J Pathol**, v. 172, n. 4, p. 951-60, Apr 2008.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 12, p. 786-801, Dec 2014.

BRIÈRE, J. B. Essential thrombocythemia. **Orphanet J Rare Dis**, v. 2, p. 3, 2007..

BROSÉUS, J. et al. Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. **Leukemia**, v. 28, n. 6, p. 1374-6, Jun 2014.

BROSÉUS, J. et al. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. **Blood**, v. 124, n. 26, p. 3964-6, Dec 2014.

BUDDE, U. et al. Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. **Blood**, v. 64, n. 5, p. 981-5, Nov 1984.

BUGGINS, A. G. et al. Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. **Br J Haematol**, v. 154, n. 2, p. 216-22, Jul 2011.

BURNS, K. et al. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. **Nature**, v. 367, n. 6462, p. 476-80, Feb 1994.

CAMPBELL, P. J.; GREEN, A. R. The myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v. 355, n. 23, p. 2452-66, Dec 2006.

CARAMAZZA, D. et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. **Leukemia**, v. 25, n. 1, p. 82-8, Jan 2011.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 932-6, Dec 2005.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, May 2011.

CAZZOLA, M. Molecular basis of thrombocytosis. **Haematologica**, v. 93, n. 5, p. 646-8, May 2008.

CAZZOLA, M.; KRALOVICS, R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3714-9, Jun 2014.

CERVANTES, F. et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 2895-901, Mar 2009.

CERVANTES, F. et al. Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol**, v. 97, n. 3, p. 635-40, Jun 1997.

CHANDRASEKARAN, V. et al. Molecular docking and analysis of interactions between vascular endothelial growth factor (VEGF) and SPARC protein. **J Mol Graph Model**, v. 26, n. 4, p. 775-82, Nov 2007.

CHANG, V. T.; YOON, C.; RAMESHWAR, P. Synergism between fibronectin and transforming growth factor- β 1 in the production of substance P in monocytes of patients with myelofibrosis. **Leuk Lymphoma**, v. 54, n. 3, p. 631-8, Mar 2013.

CHAO, M. P. et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 63, p. 63ra94, Dec 2010.

CHAUDHARY, A. K. et al. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: An overview. **Mutat Res**, v. 753, n. 1, p. 7-23, 2013 Jul-Sep 2013.

CHAUFFAILLE, M. D. L. L. F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 308-316, 2010.

CHESLER, L. et al. Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **Blood**, v. 86, n. 12, p. 4506-15, Dec 1995.

CHLENSKI, A.; COHN, S. L. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. **Semin Cell Dev Biol**, v. 21, n. 1, p. 55-65, Feb 2010.

CHLENSKI, A. et al. SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix. **Int J Cancer**, v. 118, n. 2, p. 310-6, Jan 2006.

CHOI, J. Y. et al. Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions. **J Breast Cancer**, v. 14, n. 2, p. 88-95, Jun 2011.

CHRISTOFFERSSON, G. et al. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4653-62, Nov 2012.

CLARK, C. J.; SAGE, E. H. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment--where there's SPARC, there's fire. **J Cell Biochem**, v. 104, n. 3, p. 721-32, Jun 2008.

DAWSON, M. A. et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 α from chromatin. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 819-22, Oct 2009.

DELHOMMEAU, F. et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. **N Engl J Med**, v. 360, n. 22, p. 2289-301, May 2009.

DENYS, B. et al. A real-time polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive, and specific quantification of the JAK2V617F mutation using a locked nucleic acid-modified oligonucleotide. **J Mol Diagn**, v. 12, n. 4, p. 512-9, Jul 2010.

DIMARTINO, J. F. et al. Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein. **Leukemia**, v. 20, n. 3, p. 426-32, Mar 2006.

DI RAIMONDO, F. et al. Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. **Leukemia**, v. 15, n. 6, p. 976-980, Jun 2001.

DOS SANTOS, M. T. et al. Molecular genetic tests for JAK2V617F, Exon12_JAK2 and MPLW515K/L are highly informative in the evaluation of patients suspected to have BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. **J Clin Pathol**, v. 67, n. 2, p. 176-8, Feb 2014.

EMA, M. et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. **EMBO J**, v. 18, n. 7, p. 1905-14, Apr 1999.

ERNST, T. et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. **Nat Genet**, v. 42, n. 8, p. 722-6, Aug 2010.

FABRIS, F.; RANDI, M. L. Essential thrombocythemia: past and present. **Intern Emerg Med**, v. 4, n. 5, p. 381-8, Oct 2009.

FAHLING, M. et al. Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression. **Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression**, v. 1731, n. 1, p. 32-40, Oct 15 2005.

FALCHI, L.; NEWBERRY, K. J.; VERSTOVSEK, S. New Therapeutic Approaches in Polycythemia Vera. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 15 Suppl, p. S27-33, Jun 2015.

FENOUILLE, N. et al. Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. **Cancer Res**, v. 70, n. 23, p. 9659-70, Dec 2010.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Rev**, v. 25, n. 4, p. 581-611, Aug 2004.

FIALKOW, P. J. et al. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. **Blood**, v. 58, n. 5, p. 916-9, Nov 1981.

FINAZZI, G.; BARBUI, T. How I treat patients with polycythemia vera. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5104-11, Jun 2007.

FINAZZI, G. et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2664-70, Apr 2005.

FLEISCHMAN, A. G.; MAZIARZ, R. T. Hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis: where are we now? **Curr Opin Hematol**, v. 20, n. 2, p. 130-6, Mar 2013.

FOLKMAN, J. The role of angiogenesis in tumor growth. **Semin Cancer Biol**, v. 3, n. 2, p. 65-71, Apr 1992.

FRANCKI, A. et al. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. **J Biol Chem**, v. 274, n. 45, p. 32145-52, Nov 1999.

FRANKE, K.; GASSMANN, M.; WIELOCKX, B. Erythrocytosis: the HIF pathway in control. **Blood**, v. 122, n. 7, p. 1122-8, Aug 2013.

GANGAT, N. et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 4, p. 392-7, Feb 2011.

GAUTIER, E. F. et al. The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2V617F oncogene. **Blood**, v. 119, n. 5, p. 1190-9, Feb 2012.

GIALLONGO, C. et al. SPARC expression in CML is associated to imatinib treatment and to inhibition of leukemia cell proliferation. **BMC Cancer**, v. 13, p. 60, 2013.

GOLDMAN, J. M. et al. Chronic myeloproliferative diseases with and without the Ph chromosome: some unresolved issues. **Leukemia**, v. 23, n. 10, p. 1708-15, Oct 2009.

GREEN, A.; BEER, P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 369-70, Jan 2010.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 48, p. 1014-22, Jun 1962.

HAAN, S. et al. SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. **Oncogene**, v. 28, n. 34, p. 3069-80, Aug 2009.

HANDORF, A. M. et al. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. **Organogenesis**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2015.

HARRISON, C. et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. **N Engl J Med**, v. 366, n. 9, p. 787-98, Mar 2012.

HARUTYUNYAN, A. et al. p53 lesions in leukemic transformation. **N Engl J Med**, v. 364, n. 5, p. 488-90, Feb 2011.

HASSELBALCH, H. C. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? **Blood**, v. 119, n. 14, p. 3219-25, Apr 2012.

HASSELBALCH, H. C. et al. Interferon-alpha in the treatment of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. Status and perspectives. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 3, p. 392-419, Mar 2011.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

HICKEY, M. M. et al. von Hippel-Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2alpha signaling and splenic erythropoiesis. **J Clin Invest**, v. 117, n. 12, p. 3879-89, Dec 2007.

HIRAYAMA, C. et al. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. **Pharm Res**, v. 25, n. 4, p. 827-35, Apr 2008.

HUBBELING, H. G.; FRANK, D. M.; HEXNER, E. O. Myelofibrosis 2012: it's complicated. **Ther Adv Hematol**, v. 3, n. 3, p. 131-46, Jun 2012.

HUIJSMANS, C. J. et al. Sensitive detection and quantification of the JAK2V617F allele by real-time PCR blocking wild-type amplification by using a peptide nucleic acid oligonucleotide. **J Mol Diagn**, v. 13, n. 5, p. 558-64, Sep 2011.

HUSSEIN, K. et al. JAK2(V617F) allele burden discriminates essential thrombocythemia from a subset of prefibrotic-stage primary myelofibrosis. **Exp Hematol**, v. 37, n. 10, p. 1186-1193.e7, Oct 2009.

HUSSEIN, K. et al. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 496-9, Jan 2010.

JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1144-8, Apr 2005.

JELINEK, J.; PRCHAL, J. T. Oxygen-dependent regulation of erythropoiesis. **Methods Enzymol**, v. 381, p. 201-10, 2004.

JENSEN, M. K. et al. Elevated plasma levels of TIMP-1 correlate with plasma suPAR/uPA in patients with chronic myeloproliferative disorders. **Eur J Haematol**, v. 71, n. 5, p. 377-84, Nov 2003.

JOHANSSON, P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. **Semin Thromb Hemost**, v. 32, n. 3, p. 171-3, Apr 2006.

JONES, A. V. et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 106, n. 6, p. 2162-8, Sep 2005.

KAMEDA, T. et al. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. **Blood**, v. 125, n. 2, p. 304-15, Jan 2015.

KAPRALOVA, K. et al. RUNX1 and NF-E2 upregulation is not specific for MPNs, but is seen in polycythemic disorders with augmented HIF signaling. **Blood**, v. 123, n. 3, p. 391-4, Jan 2014.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr 2010.

KITTUR, J. et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. **Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2279-84, Jun 2007.

KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med**, v. 369, n. 25, p. 2379-90, Dec 2013.

KLEIN, G. et al. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 50, n. 2, p. 87-100, May 2004.

KNAPINSKA, A. M. et al. Molecular mechanisms regulating mRNA stability: Physiological and pathological significance. **Current Genomics**, v. 6, n. 6, p. 471-486, Oct 2005.

KOMROKJI, R. S. et al. Results of a phase 2 study of pacritinib (SB1518), a JAK2/JAK2(V617F) inhibitor, in patients with myelofibrosis. **Blood**, v. 125, n. 17, p. 2649-55, Apr 2015.

KRALOVICS, R. Update on the biology of myeloproliferative neoplasms. In: BARBUI, T. e TEFFERI, A. (Ed.). **Myeloproliferative Neoplasms, Hematologic Malignancies**, 2012. p.3-10.

KRALOVICS, R.; GUAN, Y.; PRCHAL, J. T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. **Exp Hematol**, v. 30, n. 3, p. 229-36, Mar 2002.

KRALOVICS, R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v. 352, n. 17, p. 1779-90, Apr 2005.

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 16), p. 2813-9, Aug 2000.

KUITTINEN, O. et al. MMP-2 and MMP-9 expression in adult and childhood acute lymphatic leukemia (ALL). **Leuk Res**, v. 25, n. 2, p. 125-31, Feb 2001.

KUNDRANDA, M. N.; TIBES, R.; MESA, R. A. Transformation of a chronic myeloproliferative neoplasm to acute myelogenous leukemia: does anything work? **Curr Hematol Malig Rep**, v. 7, n. 1, p. 78-86, Mar 2012.

KUNIGAL, S. et al. SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA. **Int J Oncol**, v. 29, n. 6, p. 1349-57, Dec 2006.

KVASNICKA, H. M.; THIELE, J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. **Histol Histopathol**, v. 19, n. 4, p. 1245-60, Oct 2004.

LASHO, T. L.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. **N Engl J Med**, v. 363, n. 12, p. 1189-90, Sep 2010.

LAU, C. P. et al. SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma. **J Pathol**, v. 210, n. 4, p. 459-68, Dec 2006.

LE BOUSSE-KERDILÈS, M. C.; MARTYRÉ, M. C. Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Ann Hematol**, v. 78, n. 10, p. 437-44, Oct 1999.

LE CONIAT, M. et al. The human homolog of the myeloproliferative virus maps to chromosome band 1p34. **Hum Genet**, v. 83, n. 2, p. 194-6, Sep 1989.

LEHMANN, S. et al. Common deleted genes in the 5q- syndrome: thrombocytopenia and reduced erythroid colony formation in SPARC null mice. **Leukemia**, v. 21, n. 9, p. 1931-6, Sep 2007.

LEKOVIC, D. et al. Contribution of comorbidities and grade of bone marrow fibrosis to the prognosis of survival in patients with primary myelofibrosis. **Med Oncol**, v. 31, n. 3, p. 869, Mar 2014.

LEVINE, R. L. et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4139-41, May 2006.

LEVINE, R. L.; GILLILAND, D. G. Myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2190-8, Sep 2008.

LEVINE, R. L.; HEANEY, M. New advances in the pathogenesis and therapy of essential thrombocythemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 76-82, 2008.

LEVINE, R. L. et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 9, p. 673-83, Sep 2007.

LEVINE, R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 387-97, Apr 2005.

LI, B. et al. The expression of SPARC in human intracranial aneurysms and its relationship with MMP-2/-9. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58490, 2013.

LI, Z. R. et al. Activated macrophages induce neovascularization through upregulation of MMP-9 and VEGF in rat corneas. **Cornea**, v. 31, n. 9, p. 1028-35, Sep 2012.

LIU, F. et al. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. **Cancer Cell**, v. 19, n. 2, p. 283-94, Feb 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LUNDBERG, L. G. et al. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. **Am J Pathol**, v. 157, n. 1, p. 15-9, Jul 2000.

LUNDBERG, P. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 123, n. 14, p. 2220-8, Apr 2014.

MACHADO-NETO, J. A. et al. Somatic mutations of calreticulin in a Brazilian cohort of patients with myeloproliferative neoplasms. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 37, n. 3, p. 211-4, 2015 May-Jun 2015.

MARAN, J.; PRCHAL, J. Polycythemia and oxygen sensing. **Pathol Biol (Paris)**, v. 52, n. 5, p. 280-4, Jun 2004.

MARTYRÉ, M. C. et al. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. **Br J Haematol**, v. 97, n. 2, p. 441-8, May 1997.

MASSAGUÉ, J.; BLAIN, S. W.; LO, R. S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 295-309, Oct 2000.

MAXWELL, P.; SALNIKOW, K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. **Cancer Biol Ther**, v. 3, n. 1, p. 29-35, Jan 2004.

MAXWELL, P. H. et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature**, v. 399, n. 6733, p. 271-5, May 1999.

MCGAFFIN, G. et al. JAK2 V617F and CALR mutations are not mutually exclusive; findings from retrospective analysis of a small patient cohort. **Br J Haematol**, v. 167, n. 2, p. 276-8, Oct 2014.

MCMAHON, C. et al. JAK2 V617F mutation in patients with catastrophic intra-abdominal thromboses. **Am J Clin Pathol**, v. 127, n. 5, p. 736-43, May 2007.

MEDINGER, M. et al. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor-/receptor expression in myeloproliferative neoplasms: correlation with clinical parameters and JAK2-V617F mutational status. **Br J Haematol**, v. 146, n. 2, p. 150-7, Jul 2009.

MESA, R. A. How I treat symptomatic splenomegaly in patients with myelofibrosis. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5394-400, May 2009.

MESA, R. A. et al. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 973-7, Feb 2005.

MESA, R. A. et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. **Am J Hematol**, v. 61, n. 1, p. 10-5, May 1999.

MESA, R. A. et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). **Leuk Res**, v. 31, n. 6, p. 737-40, Jun 2007.

MEYER, S. C.; LEVINE, R. L. Molecular Pathways: Molecular Basis for Sensitivity and Resistance to JAK Kinase Inhibitors. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 8, p. 2051-9, Apr 2014.

MIGNOTTE, V. et al. Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL). **Genomics**, v. 20, n. 1, p. 5-12, Mar 1994.

MILOSEVIC FEENSTRA, J. D. et al. Whole exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple negative myeloproliferative neoplasms. **Blood**, Sep 2015.

MITELMAN, F.; MERTENS, F.; JOHANSSON, B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. **Nat Genet**, v. 15 Spec No, p. 417-74, Apr 1997.

MONTE-MÓR, B. D. C. R. et al. JAK2V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia. **Genet Mol Biol**, v. 30, n. 2, p. 336-8, Mar 2007.

MORAN-CRUSIO, K. et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. **Cancer Cell**, v. 20, n. 1, p. 11-24, Jul 2011.

MOULARD, O. et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. **Eur J Haematol**, Dec 2013.

MUGHAL, T. I. et al. Myelofibrosis-associated complications: pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. **Int J Gen Med**, v. 7, p. 89-101, 2014.

MURATE, T. et al. The production of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in megakaryopoiesis: possible role of platelet- and megakaryocyte-derived TIMPs in bone marrow fibrosis. **Br J Haematol**, v. 99, n. 1, p. 181-9, Oct 1997.

NANGALIA, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. **N Engl J Med**, v. 369, n. 25, p. 2391-405, Dec 2013.

NUNES, D. P. et al. CALR mutations screening in wild type JAK2(V617F) and MPL(W515K/L) Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. **Blood Cells Mol Dis**, v. 55, n. 3, p. 236-240, Oct 2015.

OH, S. T. et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 988-92, Aug 2010.

ORAZI, A. Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. **Pathobiology**, v. 74, n. 2, p. 97-114, 2007.

ORTMANN, C. A. et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med**, v. 372, n. 7, p. 601-12, Feb 2015.

OSINSKY, S. P. et al. Hypoxia level and matrix metalloproteinases-2 and -9 activity in Lewis lung carcinoma: correlation with metastasis. **Exp Oncol**, v. 27, n. 3, p. 202-5, Sep 2005.

PANTELI, K. et al. Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases detected by CD34 expression. **Eur J Haematol**, v. 72, n. 6, p. 410-5, Jun 2004.

PARDANANI, A. et al. Update On The Long-Term Efficacy and Safety Of Momelotinib, a JAK1 and JAK2 Inhibitor, For The Treatment Of Myelofibrosis. **Blood**, 122, 2013.

PARDANANI, A. et al. Infrequent occurrence of MPL exon 10 mutations in polycythemia vera and post-polycythemia vera myelofibrosis. **Am J Hematol**, v. 86, n. 8, p. 701-2, Aug 2011.

PARDANANI, A. D. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3472-6, Nov 2006.

PASSAMONTI, F. et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). **Blood**, v. 115, n. 9, p. 1703-8, Mar 2010.

PASSAMONTI, F.; MORA, B.; MAFFIOLI, M. New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms. **Curr Opin Hematol**, v. 23, n. 2, p. 137-43, Mar 2016.

PATNAIK, M. M. et al. Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival. **Eur J Haematol**, v. 84, n. 2, p. 105-8, Feb 2010.

PEARSON, T. C.; MESSINEZY, M. The diagnostic criteria of polycythaemia rubra vera. **Leuk Lymphoma**, v. 22 Suppl 1, p. 87-93, Sep 1996.

PECQUET, C. et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. **Blood**, v. 115, n. 5, p. 1037-48, Feb 2010.

PIKMAN, Y. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PLoS Med**, v. 3, n. 7, p. e270, Jul 2006.

POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 6, n. 3, p. 230-47, 1995.

PONCE, C. C. et al. MPL immunohistochemical expression as a novel marker for essential thrombocythemia and primary myelofibrosis differential diagnosis. **Leuk Res**, v. 36, n. 1, p. 93-7, Jan 2012.

PONCE, C. C. et al. Increased angiogenesis in primary myelofibrosis: latent transforming growth factor- β as a possible angiogenic factor. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 36, n. 5, p. 322-8, 2014 Sep-Oct 2014.

PRCHAL, J. T. Molecular basis of polycythemic disorders due to aberrant hypoxia sensing and its relevance to acute leukemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 25, n. 4, p. 493-7, Dec 2012.

PROULX-BONNEAU, S.; GUEZGUEZ, A.; ANNABI, B. A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21511, 2011.

QIAO, C. et al. Clinical importance of different calreticulin gene mutation types in wild-type JAK2 essential thrombocythemia and myelofibrosis patients. **Haematologica**, v. 99, n. 10, p. e182-4, Oct 2014.

QUINTÁS-CARDAMA, A. et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 2, p. 127-40, Feb 2011a.

QUINTÁS-CARDAMA, A. et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 2, p. 127-40, Feb 2011b.

REEDER, T. L. et al. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **Blood**, v. 101, n. 5, p. 1981-3, Mar 2003.

REILLY, J. T. Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis, natural history and management. **Blood Rev**, v. 11, n. 4, p. 233-42, Dec 1997.

REILLY, J. T. Pathogenetic insight and prognostic information from standard and molecular cytogenetic studies in the BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs). **Leukemia**, v. 22, n. 10, p. 1818-27, Oct 2008.

RIVERA, L. B.; BRADSHAW, A. D.; BREKKEN, R. A. The regulatory function of SPARC in vascular biology. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 19, p. 3165-73, Oct 2011.

ROTUNNO, G. et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. **Blood**, v. 123, n. 10, p. 1552-5, Mar 2014.

ROY, R.; ZHANG, B.; MOSES, M. A. Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. **Exp Cell Res**, v. 312, n. 5, p. 608-22, Mar 2006.

RUCCI, N.; SANITÀ, P.; ANGELUCCI, A. Roles of metalloproteases in metastatic niche. **Curr Mol Med**, v. 11, n. 8, p. 609-22, Nov 2011.

RUMI, E. et al. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. **Blood**, v. 123, n. 15, p. 2416-9, Apr 2014.

SALNIKOW, K. et al. Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 8, p. 1493-9, Aug 2008.

SBARDELLA, D. et al. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. **Mol Aspects Med**, v. 33, n. 2, p. 119-208, Apr 2012.

SCHIEMANN, B. J.; NEIL, J. R.; SCHIEMANN, W. P. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 10, p. 3977-88, Oct 2003.

SCHNITTGER, S. et al. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. **Haematologica**, v. 94, n. 3, p. 414-8, Mar 2009.

SCOTT, L. M. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. **N Engl J Med**, v. 356, n. 5, p. 459-68, Feb 2007.

SEMENZA, G. L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 97-106, Apr 2009.

SEMENZA, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. **Oncogene**, v. 29, n. 5, p. 625-34, Feb 2010.

SHANKAVARAM, U. T. et al. Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. **J Cell Physiol**, v. 173, n. 3, p. 327-34, Dec 1997.

SHIRANE, S. et al. JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. **Haematologica**, v. 100, n. 2, p. e46-8, Feb 2015.

SKODA, R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 1-10, 2007.

SONG, J. et al. HIF-mediated increased ROS from reduced mitophagy and decreased catalase causes neocytolysis. **J Mol Med (Berl)**, v. 93, n. 8, p. 857-66, Aug 2015.

SOUZA, M. C. et al. Application of five prognostic survival scores to primary myelofibrosis in 62 Brazilian patients. **Med Oncol**, v. 30, n. 2, p. 555, 2013.

SPIVAK, J. L. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. **Semin Hematol**, v. 41, n. 2 Suppl 3, p. 1-5, Apr 2004.

SQUIZZATO, A.; ROMUALDI, E.; MIDDELDORP, S. Antiplatelet drugs for polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. CD006503, 2008.

STAERK, J. et al. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. **Blood**, v. 107, n. 5, p. 1864-71, Mar 2006.

STEIN, B. L.; MOLITERNO, A. R. Primary myelofibrosis and the myeloproliferative neoplasms: the role of individual variation. **JAMA**, v. 303, n. 24, p. 2513-8, Jun 2010.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001.

STETLER-STEVENSON, W. G.; BERSCH, N.; GOLDE, D. W. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. **FEBS Lett**, v. 296, n. 2, p. 231-4, Jan 1992.

STEURER, M. et al. Increased angiogenesis in chronic idiopathic myelofibrosis: vascular endothelial growth factor as a prominent angiogenic factor. **Hum Pathol**, v. 38, n. 7, p. 1057-64, Jul 2007.

SUMINOE, A. et al. Expression of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of MMP (TIMP) genes in blasts of infant acute lymphoblastic leukemia with organ involvement. **Leuk Res**, v. 31, n. 10, p. 1437-40, Oct 2007.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lion, France: IARC: 439 p. 2008.

SWIERCZEK, S. et al. Presence of polyclonal hematopoiesis in females with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 29, n. 12, p. 2432-4, Dec 2015.

TEFFERI, A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. **N Engl J Med**, v. 342, n. 17, p. 1255-65, Apr 2000.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis. **Cancer Treat Res**, v. 142, p. 29-49, 2008.

TEFFERI, A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. **Leukemia**, v. 24, n. 6, p. 1128-38, Jun 2010.

TEFFERI, A. Predictors of greater than 80% 2-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients. **Blood**, v. 118, n. 17, p. 4595-8, Oct 2011.

TEFFERI, A. Myeloproliferative Neoplasms: A Decade of Discoveries and Treatment Advances. **Am J Hematol**, Oct 2015.

TEFFERI, A. et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. **Leukemia**, v. 23, n. 5, p. 905-11, May 2009.

TEFFERI, A. et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 10, p. 1356-63, Apr 2011.

TEFFERI, A. et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. **Leukemia**, v. 28, n. 7, p. 1472-7, Jul 2014.

TEFFERI, A. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. **Blood**, v. 124, n. 16, p. 2507-13; quiz 2615, Oct 2014.

TEFFERI, A.; MURPHY, S. Current opinion in essential thrombocythemia: pathogenesis, diagnosis, and management. **Blood Rev**, v. 15, n. 3, p. 121-31, Sep 2001.

TERONEN, O. et al. Identification and characterization of gelatinases/type IV collagenases in jaw cysts. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 2, p. 78-84, Feb 1995.

TITMARSH, G. J. et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. **Am J Hematol**, v. 89, n. 6, p. 581-7, Jun 2014.

TONG, W.; ZHANG, J.; LODISH, H. F. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. **Blood**, v. 105, n. 12, p. 4604-12, Jun 2005.

TRAVAGLINO, E. et al. Biological and clinical relevance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol**, v. 80, n. 3, p. 216-26, Mar 2008.

TREMBLAY, P. et al. Matrix metalloproteinase 2 attenuates brain tumour growth, while promoting macrophage recruitment and vascular repair. **J Pathol**, v. 224, n. 2, p. 222-33, Jun 2011.

TRIPODO, C. et al. Stromal SPARC contributes to the detrimental fibrotic changes associated with myeloproliferation whereas its deficiency favors myeloid cell expansion. **Blood**, v. 120, n. 17, p. 3541-54, Oct 2012.

VADIKOLIA, C. M. et al. Proteolytic matrix metalloproteinases and inhibitors in BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms: correlation with JAK2 mutation status. **Acta Haematol**, v. 126, n. 1, p. 54-62, 2011.

VAIDYA, R. et al. Monosomal karyotype in primary myelofibrosis is detrimental to both overall and leukemia-free survival. **Blood**, v. 117, n. 21, p. 5612-5, May 2011.

VAIDYA, R. et al. Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. **Am J Hematol**, v. 87, n. 11, p. 1003-5, Nov 2012.

VAINCENKER, W.; CONSTANTINESCU, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. **Oncogene**, v. 32, n. 21, p. 2601-13, May 2013.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 2002.

VANNUCCHI, A. M. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. **N Engl J Med**, v. 372, n. 17, p. 1670-1, Apr 2015.

VANNUCCHI, A. M. et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 844-7, Aug 2008.

VERSTOVSEK, S. et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. **N Engl J Med**, v. 366, n. 9, p. 799-807, Mar 2012.

VINOTHINI, G. et al. Correlation of matrix metalloproteinases and their inhibitors with hypoxia and angiogenesis in premenopausal patients with adenocarcinoma of the breast. **Clin Biochem**, v. 44, n. 12, p. 969-74, Aug 2011.

WADLEIGH, M.; TEFFERI, A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. **Int J Hematol**, v. 91, n. 2, p. 174-9, Mar 2010.

WAN, R. et al. The role of hypoxia inducible factor-1 α in the increased MMP-2 and MMP-9 production by human monocytes exposed to nickel nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 568-82, Dec 2011.

WANG, L.; WHEELER, D. A.; PRCHAL, J. T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p in hematological malignancies. **Exp Hematol**, Nov 2015.

WANG, J. C. et al. Plasma matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in patients with agnogenic myeloid metaplasia or idiopathic primary myelofibrosis. **Br J Haematol**, v. 119, n. 3, p. 709-12, Dec 2002.

WARBURG, O. Über den stoffwechsel der carcinomzelle. p.1131-1137. 1924

WARBURG, O. Über die Rolle des Eisens in der Atmung des Seeigeleis nebst Bemerkungen über einige durch Eisen beschleunigte Oxydationen. In: **WARBURG, O.** (Ed.). **Über die Katalytischen Wirkungen der Lebendigen Substanz**: Springer Berlin Heidelberg, 1928. p.47-66.

WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 21, p. 6735-41, Nov 2008.

WRÓBEL, T. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in bone marrow of patients with myeloproliferative disorders (MPD). **Pathol Oncol Res**, v. 9, n. 3, p. 170-3, 2003.

WU, Z. et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. **J Hematol Oncol**, v. 7, p. 48, 2014.

XU, N. et al. A report on the co-occurrence of JAK2V617F and CALR mutations in myeloproliferative neoplasm patients. **Ann Hematol**, v. 94, n. 5, p. 865-7, May 2015.

YAN, C.; BOYD, D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J Cell Physiol**, v. 211, n. 1, p. 19-26, Apr 2007.

YOON, D. et al. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. **J Biol Chem**, v. 281, n. 35, p. 25703-11, Sep 2006.

YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev**, v. 14, n. 2, p. 163-76, Jan 2000.

YU, X. F.; HAN, Z. C. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. **Histol Histopathol**, v. 21, n. 5, p. 519-31, May 2006.

APÊNDICES

Apêndice A. Correlação de Spearman entre e expressões de RNAm de MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 e SPARC e suas respectivas concentrações séricas nos pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós-trombocitemia essencial mielofibrose pós-policitemia vera e nos seus controles

Genes Grupos	MMP2	MMP9	TIMP1	TIMP2	SPARC
MFP	r=0,226 P=0,351 n=19	r=0,253 P=0,283 n=20	r=0,433 P=0,056 n=20	r=-0,514 P=0,020 n=20	r=0,887 P<0,001 n=11
Controle MFP	r=0,028 P=0,869 n=38	r=0,635 P<0,001 n=38	r=-0,361 P=0,025 n=38	r=-0,92 P=0,581 n=38	r=0,522 P=0,022 n=19
MFPTTE	r=0,134 P=0,574 n=20	r=-0,148 P=0,522 n=21	r=0,618 P=0,003 n=21	r=0,023 P=0,920 n=21	r=0,436 P=0,119 n=14
Controle MFPTTE	r=0,299 P=0,086 n=34	r=0,247 P=0,152 n=35	r=-0,359 P=0,034 n=35	r=-0,077 P=0,659 n=35	r=0,485 P=0,048 n=17
MFPPV	r=0,714 P=0,111 n=6	r=-0,657 P=0,156 n=6	r=0,657 P=0,156 n=6	r=0,371 P=0,468 n=6	r=* P=* n=2
Controle MFPPV	r=0,327 P=0,253 n=14	r=0,547 P=0,043 n=14	r=0,240 P=0,409 n=14	r=0,169 P=0,563 n=14	r=* P=* n=5

MFP: mielofibrose primária; MFPTTE: mielofibrose pós-trombocitemia essencial; MFPPV: mielofibrose pós-policitemia vera. *não foi possível realizar a análise estatística devido ao pequeno número amostral

Apêndice B. Correlação de Spearman entre e expressões de RNAm de MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 e suas respectivas concentrações plasmáticas nos pacientes com e trombocitemia essencial e nos seus respectivos controles

Genes Grupos	MMP2	MMP9	TIMP1	TIMP2	SPARC
TE	r=0,389 P=0,074 n=22	r=0,101 P=0,647 n=23	r=0,349 P=0,103 n=23	r=0,058 P=0,792 n=23	r=0,656 P=0,015 n=13
Controle TE	r=0,101 P=0,515 n=44	r=0,347 P=0,018 n=46	r=0,016 P=0,917 n=46	r=0,074 P=0,627 n=46	r=0,261 P=0,253 n=21

TE: trombocitemia essencial. *não foi possível realizar a análise estatística devido ao pequeno número amostral

ANEXOS

ANEXO A. Informações para os Membros da Banca Julgadora de Doutorado



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós- Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



PROJETO DE PESQUISA

Título: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF- β 1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial

Área Temática:

Área 9. A critério do CEP.

Versão: 3

CAAE: 04737312.1.0000.0067

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 88.940

Data da Relatoria: 27/08/2012

Apresentação do Projeto:

A angiogênese possui papel importante nas neoplasias mieloproliferativas (NMPs), como mielofibrose primária (MFP) e trombocitemia essencial (TE). A angiogênese é considerada um processo crucial para crescimento e metástase tumoral. Dentre as várias citocinas e fatores de crescimento que modulam a angiogênese, os principais são fator transformador do crescimento (TGF)- β 1, fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF).

O presente estudo busca uma melhor compreensão do papel da angiogênese na MFP e TE e possui como objetivo geral investigar o efeito de RNAm da família de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF- β 1 e seu papel na fisiopatologia da angiogênese em pacientes com MFP e TE.

O estudo propõe incluir 240 sujeitos de pesquisa: 80 portadores de MFP e TE atendidos na Disciplina de Hematologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e de 160 sujeitos saudáveis voluntários da Universidade de São Paulo (USP) e da comunidade. Os sujeitos da pesquisa terão idade superior a 18 anos e serão emparelhados consoante gênero e idade.

Todos os 80 pacientes e 160 controles serão submetidos à punção venosa para a coleta de sangue periférico. Para cerca de 30 pacientes ao diagnóstico e para aqueles em que houver indicação clínica, será colhida também a medula óssea. A medula óssea e a história clínica de cada um dos pacientes serão adquiridas pelo médico responsável pelo paciente.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo busca uma melhor compreensão do papel da angiogênese na MFP e na TE e possui como objetivo geral investigar o efeito de RNAm da família de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF- β 1 e seu papel na fisiopatologia da angiogênese em pacientes com MFP e TE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco relacionado à coleta de sangue venoso periférico: mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Risco relacionado à coleta de medula óssea: a coleta de medula óssea será feita independentemente do presente estudo, pois é realizada como exame assistencial para diagnóstico ou acompanhamento da doença.

Benefícios: não haverá benefícios diretos para os indivíduos saudáveis, no entanto, os pacientes

Endereço: Av.Profª Lineu Prestes, nº 580 - Bloco 17 -

Bairro: superior - Butantã **CEP:** 05.508-900

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11-)3091-3785 **Fax:** (11-)3091-3677 **E-mail:** cepcf@usp.br

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**



portadores de mielofibrose primária e trombocitemia essencial poderão ter benefícios indiretos do melhor entendimento da fisiopatologia dessas doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa possui como instituição proponente a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP e o seu responsável é a Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara.

O projeto conta com co-participação de duas instituições:

(1) Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP (Colaborador: Profa. Dra. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille).

(2) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP (Colaborador: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro).

Os pacientes serão provenientes da UNIFESP (Disciplina de Hematologia), onde serão obtidas história clínica, amostra de sangue periférico e de medula óssea (quando indicada clinicamente) pelo médico responsável pelo paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. A folha de rosto encontra-se adequada e assinada pelo responsável da Instituição Proponente.
2. TCLEs estão apresentados de forma adequada.

Recomendações:

O responsável pelo projeto respondeu adequadamente às pendências:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto se encontra adequado para aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP/FCF em reunião de 27 de agosto de 2012 aprovou o presente projeto.

SAO PAULO, 03 de Setembro de 2012

Assinado por:
Cristina Helena dos Reis Serra

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, nº 580 - Bloco 17 -
Bairro: superior - Butantã **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11-)3091-3785 **Fax:** (11-)3091-3677 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO C. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PROJETO DE PESQUISA

Título: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF- β 1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 04737312.1.0000.0067

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP Elaborado pela Instituição Coparticipante

Número do Parecer: 86717

Data da Relatoria: 31/08/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Objetivo da Pesquisa:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme Parecer Consubstanciado da instituição co-participante nº60890

Recomendações:

Nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência atendida - apresentado novo TCLE incluindo a instituição co-participante UNIFESP - PROJETO APROVADO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@epm.br;arpmeleti@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Considerações Finais a critério do CEP:

As pendências foram atendidas, o colegiado acatou o parecer do relator. Projeto aprovado.

SAO PAULO, 31 de Agosto de 2012

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@epm.br;arpmeleti@unifesp.br

ANEXO D. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Pontifícia Universidade Católica, campus Sorocaba



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF- β 1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 04737312.3.3001.5482

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 753.280

Data da Relatoria: 11/08/2014

Apresentação do Projeto:

A presente submissão é um adendo de projeto já aprovado por este CEP em 05 de agosto de 2013 (sob o número do parecer 349.654) e que atualmente está em andamento. O projeto busca uma melhor compreensão do papel da angiogênese, englobando mielofibrose primária, trombocitemia essencial e policitemia vera. Neste adendo, a pesquisadora solicita a inclusão do Serviço de Hematologia do Hospital Leonor Mendes de Barros, da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da PUC-SP, devido a dificuldade de se obter o número significativo de amostras de pacientes participantes da pesquisa provenientes da UNIFESP.

Adendo do CEP-PUC/SP: tendo em vista a presente solicitação, juntamente com a carta de ANUÊNCIA do Prof. Dr. Godofredo Campos Borges, diretor da Faculdade de Ciências Médicas (FCMS - PUC/SP) deferimos o referido pedido.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar em pacientes com neoplasia mieloproliferativa e em controles o efeito da expressão de RNAm da família das Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF-beta1, bem como avaliar a expressão dos genes de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores fisiológicos, determinar a concentração plasmática dessas proteínas e investigar a metilação de DNA e

Endereço: Rua Ministro Godói, 969 - sala 63 C
Bairro: Perdizes **CEP:** 05.015-001
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3670-8466 **Fax:** (11)3670-8466 **E-mail:** cometica@pucsp.br



Continuação do Parecer: 753.280

polimorfismos dos genes propostos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo e conforme texto do parecer 571.670

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo e conforme texto do parecer 571.670

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo e conforme texto do parecer 571.670: "(...) Recomenda-se a aprovação da inclusão do novo centro como colaborador do presente projeto de pesquisa."

Adendo do CEP-PUC/SP: tendo em vista a presente solicitação, juntamente com a carta de ANUÊNCIA do Prof. Dr. Godofredo Campos Borges, diretor da Faculdade de Ciências Médicas (FCMS - PUC/SP) deferimos o referido pedido.

Recomendações:

De acordo e conforme texto do parecer 571.670: "(...) Recomenda-se a aprovação da inclusão do novo centro como colaborador do presente projeto de pesquisa."

Adendo do CEP-PUC/SP: tendo em vista a presente solicitação, juntamente com a carta de ANUÊNCIA do Prof. Dr. Godofredo Campos Borges, diretor da Faculdade de Ciências Médicas (FCMS - PUC/SP) deferimos o referido pedido.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem Pendências e Lista de Inadequações, portanto, somos de parecer favorável à aprovação e realização do projeto de pesquisa em tela.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Ministro Godói, 969 - sala 63 C
Bairro: Perdizes **CEP:** 05.015-001
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3670-8466 **Fax:** (11)3670-8466 **E-mail:** cometica@pucsp.br



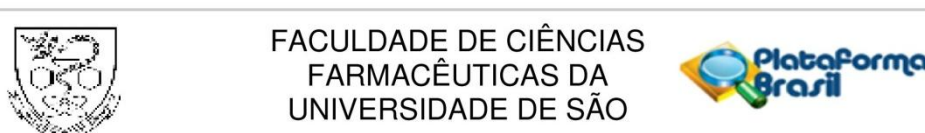
Continuação do Parecer: 753.280

SAO PAULO, 15 de Agosto de 2014

Assinado por:
Edgard de Assis Carvalho
(Coordenador)

Endereço: Rua Ministro Godói, 969 - sala 63 C
Bairro: Perdizes **CEP:** 05.015-001
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3670-8466 **Fax:** (11)3670-8466 **E-mail:** cometica@pucsp.br

ANEXO E. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo, referente ao adendo para pesquisa de mutações no gene *CALR*



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF- β 1 e seu papel na angiogênese em pacientes com mielofibrose primária e trombocitemia essencial

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 04737312.1.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 890.787

Data da Relatoria: 23/11/2014

Apresentação do Projeto:

A presente submissão é um adendo de projeto já aprovado por este CEP em 27 de março de 2014 (sob o número do parecer 571.670) e que atualmente está em andamento. O projeto busca uma melhor compreensão do papel da fisiopatologia da angiogênese nas neoplasias mieloproliferativas, englobando mielofibrose primária, trombocitemia essencial e policitemia vera. No presente adendo, a pesquisadora solícita a inclusão da pesquisa da mutação do gene da calreticulina (*CALR*) nas amostras de DNA armazenadas dos pacientes incluídos no estudo. Vale ressaltar que esta mutação foi descoberta recentemente nos pacientes com neoplasias mieloproliferativas.

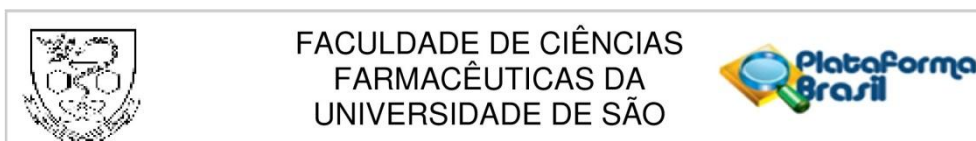
Objetivo da Pesquisa:

Investigar em pacientes com neoplasia mieloproliferativa e em controles o efeito da expressão de RNAm da família das Smads e de microRNAs na expressão gênica de TGF- β 1, bem como avaliar a expressão dos genes de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores fisiológicos, determinar a concentração plasmática dessas proteínas e investigar a metilação de DNA e polimorfismos dos genes propostos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco relacionado à coleta de sangue venoso periférico: mínimo. A coleta de sangue poderá formar

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 890.787

uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Risco relacionado à coleta de medula óssea: a coleta de medula óssea será feita independentemente do presente estudo em alguns pacientes, pois é realizada como exame assistencial para diagnóstico ou acompanhamento da doença.

Benefícios: não haverá benefícios diretos para os indivíduos saudáveis; no entanto, os pacientes com mielofibrose primária, trombocitemia essencial e policitemia vera poderão ter benefícios indiretos do melhor entendimento da fisiopatologia dessas doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de extrema importância para o melhor entendimento da fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora solicita a dispensa do TCLE para essa nova análise (mutação da CALR) nas amostras de DNA armazenadas. A pesquisadora justifica que desde o início das coletas (03/2012) diversos pacientes faleceram, visto que apresentavam doenças onco-hematológicas graves. De fato, em experiências anteriores, as tentativas de contato resultaram na localização da minoria dos participantes, além do inconveniente de parentes relatarem o falecimento.

Recomendações:

A nova solicitação de análise está incluída no escopo das análises genéticas que constam no TCLE ("genes no seu DNA relacionados às doenças mielofibrose primária, trombocitemia essencial e policitemia vera") e que, portanto, não altera o objetivo da pesquisa. Recomenda-se a aprovação do adendo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se a aprovação do adendo.

Situação do Parecer:

Aprovado

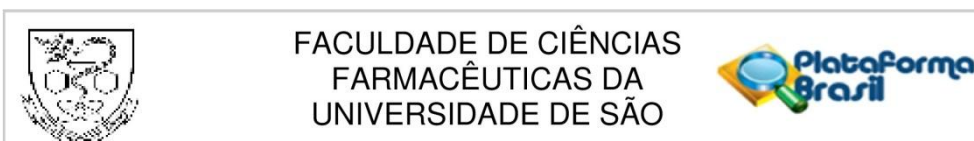
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o adendo pode ser aprovado.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcl@usp.br



Continuação do Parecer: 890.787

SAO PAULO, 28 de Novembro de 2014

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfci@usp.br

ANEXO F. Currículo Lattes

Luciene Terezina de Lima

Curriculum Vitae

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Análises Clínicas.
Faculdade de Ciências Farmaceuticas - Universidade de Sao Paulo, FCF-USP, Brasil
com período sanduíche em University of Utah (Orientador : Josef T Prchal)
Título: PAPEL DAS METALOPROTEINASES E DE SEUS REGULADORES NA ANGIOGÊNESE DE PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS
Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara
Co-orientador: Fabiola Attié de Castro
- 2010 - 2012** Mestrado em Ciências Farmacêuticas Análises Clínicas.
Faculdade de Ciências Farmaceuticas - Universidade de Sao Paulo, FCF-USP, Brasil
Título: Estudo da expressão de transportadores de membrana ABCG2 E SCLO1A2 e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica, Ano de obtenção: 2012
Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2004 - 2009** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
Título: Detecção molecular de Escherichia coli em creme lanete
Orientador: Marília Caixeta Franco Ariosia

Formação complementar

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em El componente genético de enfermidades complejas. (Carga horária: 6h).
Faculdade de Ciências Farmaceuticas - Universidade de Sao Paulo, FCF-USP, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em MANUSEIO, DESCARTE E TRANSPORTE DE RESIDUO QUIMICO.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Next Generation Sequencing. (Carga horária: 12h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Genoma, Proteoma e Universo Celular. (Carga horária: 80h).
Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP, CHR HCFMRP-USP, Brasil
- 2008 - 2008** XIII Curso de Verão em Genética.
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em Projeto Rondon: Operação de Inverno 2008. (Carga horária: 160h).

	Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2008 - 2008	Curso de curta duração em Pesquisa Clínica. (Carga horária: 8h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP, FCFRP-USP, Brasil
2008 - 2008	Curso de curta duração em Perícia Criminal- Toxicologia Forense. (Carga horária: 8h). INC-Integra Cursos e Eventos, INC, Brasil
2007 - 2007	IV Curso de Verão de Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 88h). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, FMRP-USP, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Estudo da Função Renal: Biologia molecular. (Carga horária: 3h). Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Imunocitoquímica Básica. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Toxicologia Forense e Controle de Dopagem. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Atenção Farmacêutica à Pacientes Geriátricos. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2005 - 2005	Extensão universitária em Curso Teórico-Prático de Primeiros Socorros. (Carga horária: 25h). Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Atenção Farmacêutica ao Paciente com HIV. (Carga horária: 3h). Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Atenção Farmacêutica em Distúrbios Menores. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmaceuticas - Universidade de Sao Paulo - FCF-USP

Vínculo institucional

2012 - Atual	Vínculo: Doutorado , Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
2010 - 2012	Vínculo: Mestrado, Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

08/2011 - 12/2011 Treinamento, Depto de Análises Clínicas

Especificação:

Aluna Bolsista do Programa de Aperfeiçoamento Estudantil (PAE). Monitora da disciplina de Fisiopatologia III.

08/2010 - 12/2010 Treinamento, Depto de Análises Clínicas

Especificação:

Aluna Bolsista do Programa de Aperfeiçoamento Estudantil (PAE). Monitora da disciplina de Hematologia Clínica.

2. Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo - FCF-USP

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 40, Regime: Integral

3. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária, Regime: Parcial

4. Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Professor de Biologia do curso Pré-Vestibular , Carga horária: 4, Regime: Parcial

2004 - 2009 Vínculo: Aluna de Graduação , Enquadramento funcional: Aluna de Graduação , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

03/2009 - 07/2009 Treinamento, Universidade Federal de Alfenas

Especificação:

Monitora em BIOQUÍMICA CLÍNICA.

07/2008 - 07/2008 Extensão Universitária, Universidade Federal de Alfenas

Especificação:

PROJETO RONDON - OPERAÇÃO INVERNO 2008. Transformação da Unidade Básica de Saúde do Município de Santarém Novo-PA em Unidade Mista de Saúde. Carga horária: 160 horas

03/2008 - 07/2008 Treinamento, Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Unifal-MG

Especificação:

Monitora da disciplina de BIOLOGIA MOLECULAR.

03/2007 - 07/2007 Treinamento, Departamento de Ciências Exatas- Laboratório de Bioquímica

Especificação:

Monitora da disciplina de BIOQUÍMICA.

04/2006 - 06/2009 Extensão Universitária, Universidade Federal de Alfenas

Especificação:

Título do Projeto: APOIO DIDÁTICO EM BIOLOGIA.

04/2006 - 12/2006 Extensão Universitária, Universidade Federal de Alfenas

Especificação:

Título do projeto: MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS PARA COLETORES DE MATERIAL RECICLÁVEL. Carga horária de 122 horas.

04/2006 - 12/2006 Extensão Universitária, Universidade Federal de Alfenas

Especificação:

Título do Projeto: A IMPORTÂNCIA DAS CONDIÇÕES DE HIGIENE EM ÁREAS DE RECREAÇÃO INFANTIL. Carga horária 70 horas.

02/2005 - 08/2005 Estágio, Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos

Estágio:

Aprendizagem das técnicas utilizadas em Biologia Molecular e Microbiologia básica com carga horária de 191 horas.

Prêmios e títulos

2015 Travel award -11th International Calreticulin Workshop, International Federation for Cell Biology (IFCB)

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. NUNES, DANIELA PRUDENTE TEIXEIRA, **DE LIMA, LUCIENE TEREZINA**, CHAUFFAILLE, MARIA DE LOURDES, MITNE-NETO, MIGUEL, DOS SANTOS, MARCOS TADEU, CLIQUET, MARCELO GIL, GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA MARIA

CALR mutations screening in wild type JAK2V617F and MPLW515K/L Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. *Blood Cells, Molecules & Diseases (Print)*. , v.55, p.236 - 240, 2015.

2. SWIERCZEK, S, **LIMA, L T**, TASHI, T, KIM, S J, GREGG, X T, PRCHAL, J T

Presence of Polyclonal Hematopoiesis in Females with Ph-negative Myeloproliferative Neoplasms. *Leukemia*. , v., p.. - ., 2015.

3. VIVONA, DOUGLAS, **LIMA, LUCIENE**, RODRIGUES, ALICE, BUENO, CAROLINA, ALCANTARA, GREYCE, BARROS, LUIZA, HUNGRIA, VANIA, CHIATTONE, CARLOS, CHAUFFAILLE, MARIA, GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA

ABC1 haplotypes are associated with P ζ gp activity and affect a major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with a standard dose of imatinib. *Oncology Letters*. , v.7, p.1313 - 1319, 2014.

4. **LIMA, LUCIENE TEREZINA**, VIVONA, DOUGLAS, BUENO, CAROLINA TOSIN, HIRATA, ROSARIO D. C., HIRATA, MARIO H., LUCHESSI, ANDRÉ D., CASTRO, FABIÓLA ATTÍE, CHAUFFAILLE, MARIA DE LOURDES F., ZANICHELLI, MARIA A., CHIATTONE, CARLOS S., HUNGRIA, VANIA T. M., GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA M.

Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Medical Oncology*. , v.31, p.851 - 862, 2014.

5. **LIMA, LUCIENE TEREZINA DE**, BUENO, CAROLINA TOSIN, VIVONA, DOUGLAS, HIRATA, ROSARIO DOMIGUEZ CRESPO, HIRATA, MARIO HIROYUKI, HUNGRIA, VANIA TIESTSCHE DE MORAES, CHIATTONE, CARLOS SÉRGIO, ZANICHELLI, MARIA APARECIDA, CHAUFFAILLE, MARIA DE LOURDES LOPES FERRARI, GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA MARIA

Relationship between SLCO1B3 and ABCA3 polymorphisms and imatinib response in chronic myeloid leukemia patients. *Hematology (Luxembourg. Print)*. , v.20, p.140724035945000 - 137-142, 2014.

6. VIVONA, D., BUENO, C. T., **LIMA, L. T.**, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H., LUCHESSI, A. D., ZANICHELLI, M. A., GUERRA-SHINOHARA, E. M.

ABC1 haplotype is associated with major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with standard-dose of imatinib.. *Blood Cells, Molecules & Diseases (Print)*. , v.48, p.132 - 136,

2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **LIMA, L. T.**, NUNES, D. P. T., GOMES, G. W., CHAUFFAILLE, MARIA DE LOURDES, SILVA, M. R., PONCE, C., CASTRO, FABIOLA ATTÍE, CLIQUET, M. G., DOS SANTOS, MARCOS TADEU, MITNE-NETO, MIGUEL, GUERRA-SHINOHARA, E. M.

Serum levels of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors are elevated in JAK2V617F mutated compared to CARL mutated myelofibrosis and triple negative essential thrombocythemia patients In: 20th Congress the European Hematology Association, 2015, Austria.

Haematologica. , 2015. v.100. p.523 - 523

2. NUNES, D. P. T., **LIMA, L. T.**, GOMES, G. W., CHAUFFAILLE, MARIA, SILVA, M. R., PONCE, C., CLIQUET, M. G., SANTOS, M. T., GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA M.

Elevated mRNA Expression of FGF2 and TGFB1 Genes in Myelofibrosis and Essential Thrombocythemia Patients In: 56th ASH Annual Meeting & Exposition, 2014, São Francisco.

Blood. , 2014. v.124. p.5179 - 5179

3. **LIMA, L. T.**, NUNES, D. P. T., GOMES, G. W., CHAUFFAILLE, MARIA, SILVA, M. R., PONCE, C., CASTRO, FABIOLA ATTÍE, GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA M.

Gene expression and protein levels of MMPs, TIMPS and SPARC and their relationship with plasma markers of angiogenesis in myelofibrosis and essential thrombocythemia patients In: 19th European Hematology Association, 2014, Milão.

Haematologica. , 2014.

4. **LIMA, L. T.**, NUNES, D. P. T., GOMES, G. W., CHAUFFAILLE, MARIA, SILVA, M. R., PONCE, C., CASTRO, FABIOLA ATTÍE, GUERRA-SHINOHARA, E. M.

Higher MMP9 and FGF2 Protein Levels and Elevated MMP9/TIMP Ratios Were Associated with JAK2V617F Mutation Regardless of Allele Burden in Myelofibrosis In: 56th American Society Hematology, 2014, São Francisco.

Blood. , 2014. v.124.

5. GOMES, G. W., **LIMA, L. T.**, NUNES, D. P. T., RODRIGUES, A. C., CASTRO, FABIOLA ATTÍE, TOGNON-RIBEIRO, R., GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA M.

JAK-STAT pathway inhibitor do not modulate drug transporters gene expressions in JAK2V617F positive cell lines In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão.

Haematologica - The hematology journal. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v.99. p.661 - 662

6. NUNES, D. P. T., **LIMA, L. T.**, GOMES, G. W., YASSUI, C. G., CHAUFFAILLE, MARIA, SILVA, M. R., PONCE, C., CASTRO, FABIOLA ATTÍE, GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA M.

TGF-B signaling pathway molecular regulation by SMADs in myelofibrosis patients In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão.

Haematologica - The hematology journal. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v.99. p.660 - 661

7. VIVONA, D., **LIMA, LUCIENE TEREZINA**, RODRIGUES, A. C., BUENO, CAROLINA TOSIN, GAITANI, C. M., CHIATTONE, C. S., HUNGRIA, VANIA T. M., CHAUFFAILLE, MARIA DE LOURDES F., GUERRA-SHINOHARA, E. M.

ABCB1 Haplotypes Are Associated With Lower P-Gp Activity and Major Molecular Response But Do Not Affect Imatinib Plasma Levels In Chronic Myeloid Leukemia Patients In: 55th ASH Annual Meeting and Exposition, 2013, New Orleans.

Blood. , 2013. v.122. p.3860 -

8. NUNES, D. P. T., **LIMA, LUCIENE TEREZINA**, SANTOS, L. C., PONCE, C., GUERRA-SHINOHARA, E. M., SILVA, M. R., CHAUFFAILLE, M. L. L. F.

Angiogenesis assessment in primary myelofibrosis and polycythemia vera patients In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2013, Brasília.

REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA. , 2013. v.35. p.193 -

9. VIVONA, D., LIMA, L. T., BUENO, C. T., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C., LUCHESSI, A. D.,

Zanichelli, M. A, CHIATTONE, C. S., GUERRA-SHINOHARA, E. M.
 ABCG2 and SLC22A1 expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia.
 In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY 2011 (ASH 2011), 2011,
 San Diego - California.

ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY 2011 (ASH 2011)- , 2011.

10. GUERRA-SHINOHARA, E. M., VIVONA, D., BUENO, C. T., LIMA, L. T., HIRATA, R. D. C.,
 HIRATA, M. H., LUCHESSI, A. D., Zanichelli, M. A, CHIATTONE, C. S.
 Haplotype for polymorphisms C1236T, C3435T and G2677T/A in MDR1 gene is associated with major
 molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with standart-dose of imatinib. In:
 16th Congress of the European Hematology Association, 2011, London.

EHA 16th Congress . , 2011.

11. LIMA, L. T., VIVONA, D., BUENO, C. T., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H., LUCHESSI, A. D.,
 Zanichelli, M. A, CHIATTONE, C. S., GUERRA-SHINOHARA, E. M.
 Imatinib Response is influenced by ABCG2 and SLC22A1 gene expression in Chronic Myeloid
 Leukemia In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.

Revista Brasileira e Hematologia e Hemoterapia. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de
 Hematologia e Hemoterapia, 2011. v.33.

12. GUERRA-SHINOHARA, E. M., BUENO, C. T., LIMA, L. T., VIVONA, D., HIRATA, M. H., HIRATA,
 R. D. C., LUCHESSI, A. D., CHIATTONE, C. S., Zanichelli, M. A
 SLC22A1 polymorphisms are not associated with cytogenetic and molecular response to imatinib
 mesylae in chronic myelogenous leukemia patients In: 16th European Hematology Association, 2011,
 2011, London.

16th European Hematology Association, 2011 . , 2011.

13. VIVONA, D., BUENO, C. T., LIMA, L. T., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H., LUCHESSI, A. D.,
 Zanichelli, M. A, CHIATTONE, C. S., GUERRA-SHINOHARA, E. M.
 Associação entre os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T no gene ABCB1 e marcadores de
 resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica. In: Associação entre
 os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T no gene ABCB1 e marcadores de resposta ao mesilato
 de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica., 2010, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2010 . , 2010. v.32. p.206 - 206

14. BUENO, C. T., VIVONA, D., LIMA, L. T., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H., LUCHESSI, A. D.,
 Zanichelli, M. A, CHIATTONE, C. S., GUERRA-SHINOHARA, E. M.
 Association between the C1236T, C3435T AND G2677T/A polymorphisms in the ABCB1 gene and
 response markers for imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leucemia. In: XLV SUPFAB,
 2010, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences . , 2010. v.46. p.85 - 85

15. TERCETI, M. S., LIMA, L. T., Damasceno, G. S. B, Cannavan, F. S., Tsai, S. M., Silva, P. M. F.,
 Franco, M. C.
 A multiplex polymerase chain reaction method for reliabe detection of bacteria pathogenic In: II
 Workshop da Pós-Graduação, IX Mostra de Extensão e XII Jornada de Iniciação ciêntífica de Alfenas,
 2007, Alfenas.

Anais da JICA . , 2007.

16. LIMA, L. T., TERCETI, M. S., VIEIRA, D. C. M, Tsai, S. M., Silva, P. M. F., Franco, M. C.
 Detecção molecular de Escherichia coli em creme lanette e creme não iônico In: XXII Reunião Anual
 Federação de Sociedades de Biologia Experimenta - FeSBE, 2007, Águas de Lindóia.

Anais da XXII FeSBE . , 2007.

17. TERCETI, M. S., Damasceno, G. S. B, LIMA, L. T., VIEIRA, D. C. M, Silva, P. M. F., Franco, M. C.
 Diagnóstico simultâneo de E. coli e P. aeruginosa, em creme lanete, pela PCR duplex e comparação
 com métodos convencionais In: XXII Reunião Anual Federação de Sociedades de Biologia
 Experimenta - FeSBE, 2007, Águas de Lindóia.

Anais da XXII FeSBE . , 2007.

18. GRANATO, L. M., SOUZA, J. M. O., LIMA, L. T., CATÃO, V. S., Araújo, A., RODRIGUES, M. M. A importância das condições de higiene em áreas de recreação infantil In: Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, 2006, Alfenas.

Anais da Semana Nacional da Ciência e Tecnologia. , 2006.

19. LIMA, L. T., NUNES, E. C., GALDINO, F. C., BIOJONE, C., TRÉZ, T. A Apoio Didático em Biologia In: Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, 2006, Alfenas.

Anais da Semana Nacional da Ciência e Tecnologia. , 2006.

20. LIMA, L. T., TERCETI, M. S., VIEIRA, D. C. M, Tsai, S. M., Silva, P. M. F., Franco, M. C. Detecção molecular de *Escherichia coli* em creme lanette e creme não iônico In: Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, 2006, Alenas.

Anais da Semana Nacional da Ciência e Tecnologia. , 2006.

21. TERCETI, M. S., LIMA, L. T., VIEIRA, D. C. M, Silva, P. M. F., Franco, M. C. Diagnóstico molecular de *Pseudomonas aeruginosa* contaminante de creme lanete In: XXI Reunião Anual Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia.

Anais da XXI FeSBE. , 2006.

22. TERCETI, M. S., LIMA, L. T., Damasceno, G. S. B, VIEIRA, D. C. M, Tsai, S. M., Silva, P. M. F., Franco, M. C.

Diagnóstico simultâneo de *E. coli* e *P. aeruginosa*, em creme lanete, pela PCR duplex e comparação com métodos convencionais In: Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, 2006, Alfenas.

Anais da Semana Nacional da Ciência e Tecnologia. , 2006.

23. SOUZA, J. M. O., LIMA, L. T., OLIVEIRA, L. A., MAGALHÃES, V. F.

Medidas de Primeiros Socorros para Coletores de Material Reciclável In: Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, 2006, Alfenas.

Anais da Semana Nacional da Ciência e Tecnologia. , 2006.

24. TERCETI, M. S., LIMA, L. T., Damasceno, G. S. B, VIEIRA, D. C. M, Tsai, S. M., Silva, P. M. F., Franco, M. C.

Utilização da PCR na detecção de *Salmonella sp.* em creme lanete In: Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, 2006, Alfenas.

Anais da Semana Nacional da Ciência e Tecnologia. , 2006.

25. TERCETI, M. S., LIMA, L. T., Silva, P. M. F., Franco, M. C.

Estudos preliminares para o diagnóstico molecular de *Escherichia coli* contaminante de dipirona de sódio In: XI Jornada de Iniciação Científica de Alfenas, 2005, Alfenas.

Anais da JICA. , 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. TERCETI, M. S., Damasceno, G. S. B, LIMA, L. T., Silva, P. M. F., Franco, M. C.

Optimization of MPCR for simultaneous detection of pathogenic bacteria In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007, Ribeirão Preto.

Anais do CIFARP 2007. , 2007.

2. LIMA, L. T., Damasceno, G. S. B, Cannavan, F. S., Tsai, S. M., Silva, P. M. F., Franco, M. C.

Validação do método molecular de detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em creme lanete In: II Workshop da Pós-Graduação, IX Mostra de Extensão e XII Jornada de Iniciação científica de Alfenas, 2007, Alfenas.

Anais da JICA. , 2007.

3. LIMA, L. T., Damasceno, G. S. B, Cannavan, F. S., Tsai, S. M., Silva, P. M. F., Franco, M. C.

Validation of the *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* molecular detection method in lanette cream In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007, Ribeirão Preto.

Anais do CIFARP 2007. , 2007.

4. TERCETI, M. S., VIEIRA, D. C. M, LIMA, L. T., Silva, P. M. F., Franco, M. C.
Preliminary Studies for The Molecular Diagnosis of Escherichia coli Drug-Contaminants In: 5th
International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2006, Ribeirão Preto.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2006. v.41. p.183 - 183

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. LIMA, L. T.

Técnicas em Biologia Molecular, 2008. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

ANEXO G. Ficha do aluno

15/02/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6290364/2 - Luciene Terezina de Lima

Email: lucienelima@usp.br
Data de Nascimento: 25/10/1985
Cédula de Identidade: RG - MG-13.655.414 - MG
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerais - Brasil - 2009
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 28/02/2012
Início da Contagem de Prazo: 28/02/2012
Data Limite para o Depósito: 29/02/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara - 28/02/2012 até o presente. Email: emguerra@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Fabiola Attié de Castro - 21/08/2012 até o presente. Email: castrofa@fcrp.usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 28/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 18/03/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 28/02/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 15/02/2016 16:18:57

15/02/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6290364/2 - Luciene Terezina de Lima

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HEP5800-3/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/03/2012	10/05/2012	90	0	-	-	N	Pré-matricula Indeferida
FBC5803-2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5748-3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5771-7/1	Bioinformática Aplicada às Análises Clínicas	10/07/2012	23/07/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	0	-	-	N	Pré-matricula Indeferida
MPT5780-2/1	Genética Forense (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	07/08/2012	10/09/2012	75	5	90	A	N	Concluída
FBC5709-5/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	13/08/2012	16/09/2012	75	5	78	A	N	Concluída
MPT5793-1/2	Citogenômica I (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	19/09/2012	13/11/2012	120	0	-	-	N	Matricula cancelada
IBI5030-1/1	Curso Avançado de Sinalização Celular e Redes de Modulação Gênica (Curso Interunidades: Bioinformática - Universidade de São Paulo)	22/11/2012	12/12/2012	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	0	-	-	N	Pré-matricula Indeferida
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	94	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	29
Estágios:			
Total:	0	20	29

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 15/02/2016 16:18:58

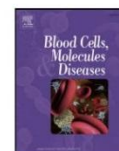
ANEXO H. Artigo publicado no periódico *Blood Cells, Molecules and Diseases*

Blood Cells, Molecules and Diseases 55 (2015) 236–240



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

CALR mutations screening in wild type $JAK2^{V617F}$ and $MPL^{W515K/L}$ Brazilian myeloproliferative neoplasm patients



Daniela Prudente Teixeira Nunes ^{a,1}, Luciene Terezina de Lima ^{a,1}, Maria de Lourdes Chauffaille ^b, Miguel Mitne-Neto ^c, Marcos Tadeu dos Santos ^c, Marcelo Gil Clquet ^d, Elvira Maria Guerra-Shinohara ^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Grupo Fleury, Pesquisa e Desenvolvimento, São Paulo, Brazil

^d Departamento de Hematologia, Complexo Hospitalar de Sorocaba, Universidade Católica de São Paulo, Sorocaba, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 5 March 2015

Revised 7 July 2015

Accepted 8 July 2015

Available online 9 July 2015

Keywords:

CALR

Myeloproliferative neoplasms

Myelofibrosis

Essential thrombocythemia

$JAK2^{V617F}$

ABSTRACT

Some myeloproliferative neoplasm (MPN) patients harbor $JAK2^{V617F}$ mutation, and *CALR* mutations were recently discovered in wild type (WT) $JAK2^{V617F}$. We evaluated the frequency and type of *CALR* mutations, and clinical and hematological characteristics in WT $JAK2^{V617F}$ and $MPL^{W515K/L}$ MPN patients. Sixty-five patients were included: 21 with primary myelofibrosis (PMF), 21 with myelofibrosis post-essential thrombocythemia (MPET) and 23 with essential thrombocythemia (ET). Screening for $JAK2^{V617F}$ and $MPL^{W515K/L}$ were performed using real-time PCR, while *CALR* mutations were analyzed by fragment analysis and Sanger sequencing. $JAK2^{V617F}$ was the most frequent mutation (54.5%) and one patient (1.5%) harbored MPL^{W515L} . *CALR* mutations were present in 38.1% of PMF, 12.5% of ET and 33.3% of MPET patients. Five types of *CALR* mutations were detected, among which type 1 (32.1%) and type 2 (21.4%) were found to be the most common. A novel *CALR* mutation in a PMF patient was found. Patients carrying *CALR* mutations had higher platelet count and less presence of splenomegaly than $JAK2^{V617F}$, while triple negatives had higher C-reactive protein levels than *CALR* mutant carriers. Screening for *CALR* mutations and its correlation with clinical features could be useful for the characterization of MPN patients and result in its incorporation into a new prognostic score.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal hematopoietic disorders characterized by aberrant expansion of one or more myeloid lineages. The most common Philadelphia-negative MPNs are primary myelofibrosis (PMF), essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV) [1].

The identification of a single base substitution in *JAK2*, the gene encoding the protein janus kinase 2, provided the first molecular biomarker of these MPN. $JAK2^{V617F}$ mutation was found in 95% of patients with PV and in 60% to 65% of those with PMF and ET [2–5]. The remaining 5% of patients with PV carry a somatic mutation of *JAK2* exon 12 [6,7]. Subsequent studies showed that somatic mutations of *MPL* exon 10, mainly involving codon W515, are found in about 5% of PMF and ET patients [8–10]. Additional mutations were also identified in MPN patients but they affect only a small minority.

Recently, two studies identified mutations in *CALR* exon 9 gene in the 70 to 84% of wild type (WT) $JAK2^{V617F}$ and $MPL^{W515K/L}$ PMF and ET patients providing strong genetic evidence that *CALR* mutations have an important role in the pathogenesis of these disorders [11,12]. These mutations are insertions or deletions leading to a frameshift responsible for modifying the C-terminal part of the calreticulin protein. The last four amino acids of calreticulin (KDEL), which contain the endoplasmic reticulum-retention signal, becomes positively charged and the reticulum targeting KDEL sequence is abrogated, which disturbs its cellular localization [11].

The frequency of *CALR* mutations is about 20% to 25% of all patients with PMF and ET [11,12]. To date, more than 50 different types of mutations in *CALR* have been detected, but type 1 variant (p.L367fs*46) resulting from 52 bp deletion and type 2 variant (p.K385fs*47) resulting from 5 bp TTGTC insertion are the most frequent types, overall being found in more than 80% of all patients with mutant *CALR* [13].

Since *CALR* mutations discovery, several studies have correlated these mutations with clinical data and patient outcome in MPNs [14–24]. Interestingly, the presence of *CALR* mutation in peripheral granulocytes of two PV patients negative for both $JAK2^{V617F}$ and $JAK2^{\text{exon12}}$ mutations [25] was described. The coexistence of $JAK2^{V617F}$ and *CALR* mutations have been found in rare cases of refractory

* Corresponding author at: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Av. Professor Lineu Prestes, 580, CEP: 05508-000 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: emguerra@usp.br (E.M. Guerra-Shinohara).

¹ Both authors contributed equally.

anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis [26], PMF [16,27], ET [28–30] and PV [30].

The identification and evaluation of disease-specific mutations could be valuable for diagnosis, prognosis and monitoring of treatment response. In the present study the frequency and types of *CALR* mutations were described, and hematological and clinical features of *JAK2*^{V617F} patients were compared with those carrying *CALR* mutations and triple negatives.

2. Patients and methods

2.1. Patients and study design

This study enrolled 65 MPN patients, consisting of 21 PMF and 23 ET diagnosed according to World Health Organization (WHO) criteria (2008) [31]. Other 21 myelofibrosis post-essential thrombocythemia (MPET) patients were diagnosed according to the International Working Group for MPN Research and Treatment [32]. Patients were selected from the Discipline of Hematology and Hemotherapy from the Universidade Federal de São Paulo and from the Hematology Division of the Universidade Católica de São Paulo, Brazil. Clinical and laboratory parameters were obtained at the time of the first diagnosis or when peripheral blood for genomic DNA samples was collected. Hematological analysis was conducted by Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, CA, USA) and C-reactive protein levels were determined by ultrasensitive immunoturbidimetry. Genomic DNA samples were tested at the Fleury Group Center, in a laboratory certified according to the provisions of the College of American Pathologists (CAP), ISO-9001, ISO-14001 and the Brazilian Clinical Laboratory Accreditation Program (PALC). This study was conducted in accordance with the guidelines of the Institutional Ethics Committee.

2.2. Detection of *JAK2*, *MPL* and *CALR* mutations

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a QIAamp Blood Mini Kit DNA extraction (PreAnalytix/Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.

Screening for *JAK2*^{V617F} (and allele burden) and *MPL*^{W515K/L} mutations were performed using TaqMan-based real-time PCR method as previously described [33]. Only WT *JAK2*^{V617F} samples were analyzed for *MPL*^{W515K/L} mutations. The ones without *MPL*^{W515K/L} mutations were further analyzed for *CALR* mutations.

CALR exon 9 mutations were examined by fragment analysis using high resolution sizing of fluorescence-labeled PCR products. A PCR reaction was set up with a M13F (−21) sequence attached to the forward primer (TGTAACACGACGGCCAGTCTGGCACCATTGACAACCT) and a M13R (2) attached to the reverse primer (CAGGAAACAGCTATGACCGG CCTCTCTACAGCTCGTC), besides a M13F primer (TGTAACACGACGGC CAGT) attached to a FAM fluorophore.

PCR reactions were prepared using 10 μL of PCR mix (2×) (Promega, Madison WI, USA), 0.15 μM of each primer, 5 μL of DNA template and water to a final reaction volume of 20 μL. The PCR cycling conditions were: an initial denaturation at 95 °C for 10 min; 40 cycles of denaturation at 96 °C for 30 s, annealing at 57 °C for 30 s, plus 20 cycles of annealing at 53 °C, extension at 72 °C for 30 s; and a final extension at 72 °C for 10 min. Fragment products were analyzed by capillary electrophoresis (Applied Biosystems 3500; Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA) and evaluated by GeneMapper® ID-X Software Version 1.2 (Applied Biosystems, Foster City/CA, EUA). All the samples were further analyzed by Sanger sequencing. A PCR reaction was set up with the same forward and reverse primers described above. The PCR final volume and concentrations were the same as for the previous reaction, and the PCR cycling excluded the annealing temperature to 53 °C in the last 20 cycles. Mutations were identified using CLC Genomics Workbench (Qiagen, Aarhus, Denmark), and the secondary structure of the

protein was predicted using EMBOSS Transeq (EMBL-EBI, UK) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) and JPRED [33].

2.3. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using SPSS version 17.0 (IBM, USA) and GraphPad Prism™ version 5.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) software. P-values of less than 0.05 were considered significant. Numerical variables have been summarized by their median and interquartile range and categorical variables by number of patients and percentage (%) of each category. Allele burden results were presented as the median of percentage of mutated alleles, and groups were compared by Kruskal–Wallis test. Mann–Whitney test was used for continuous variables, while for categorical variables Chi-square and Fisher's exact tests were used.

3. Results

Among the 65 studied patients, 36 (55.4%) presented *JAK2*^{V617F}, one (1.5%) *MPL*^{W515L}, and 18 (27.7%) *CALR* mutations. Ten patients (15.4%) were considered triple negative, as they lacked *JAK2*^{V617F}, *MPL*^{W515K/L} or *CALR* mutations. The mutation frequencies in each studied group are described in Fig. 1.

The median of allele burden for *JAK2*^{V617F} was 25.5% in PMF, 9.0% in ET and 9.9% in MPET patients, and the differences were not significant ($p = 0.351$). Two *JAK2*^{V617F} positive patients also presented karyotype alterations, one PMF (46,XX, del(20)(q4q13)[2]/46,XX[15]) and one MPET patient (46,XY,del(20)(q11.2)[5]). Both of them had higher allele burden percentages than the median of their respective groups (79.7% and 70.8%, respectively).

Among 29 WT *JAK2*^{V617F} and *MPL*^{W515K/L} patients, 18 (62.1%) presented *CALR* mutations: 80.0% (8/10) of those with PMF, 77.8% (7/9) of those with MPET, and 30.0% (3/10) of those with ET. The most frequent *CALR* mutation in all patients were type 1 (p.L367fs*46), followed by type 2 (p.K385fs*47). There were nine (32.1%) type 1 and six (21.4%) type 2 mutations, while the remaining included type 32 (p.K385fs*46) and type 40 (p.K375fd*49), as well as a novel mutation (1125delA). ET patients did not harbor type 2 mutation. The group distribution of *CALR* mutations are showed in Table 1.

All the samples showed concordance between fragment and sequencing analysis of *CALR* exon 9 mutations, except for the PMF patient harboring the novel mutation (1125delA). The misidentification of a single base deletion in the fragment analysis can be attributed to its technical limitation to recognize small insertions and deletions. This patient did not show any different clinical or hematological data than patients harboring type 1 or type 2 mutations ($p > 0.05$). This 61-year-old man had severe anemia (hemoglobin level, 5.8 g/dL), a leukocyte count of 4.200/mm³ and platelet count of 133.000/mm³. He did not present thrombotic events or diabetes, but he was hypertensive. The novel mutation 1125delA leads to a frameshift that changes the secondary structure of the protein resulting in an alpha-helix conformation.

Clinical and hematological features of 64 patients stratified by their mutation profile (*CALR* mutated, *JAK2*^{V617F} and triple negative) are listed in Table 2. *MPL*^{W515L} positive patient was not included in these analyses. Patients carrying *CALR* mutations had higher platelet count ($p = 0.032$) and lower splenomegaly frequency ($p = 0.030$) than *JAK2*^{V617F}, while triple negative patients had higher body mass index than *JAK2*^{V617F} carriers ($p = 0.011$). Furthermore, triple negative patients also had higher C-reactive protein levels ($p = 0.011$) than patients carrying *CALR* mutations.

PMF *CALR* mutant carriers showed lower red blood cell count ($p = 0.048$), hemoglobin levels ($p = 0.021$), hematocrit ($p = 0.021$), C-reactive protein levels ($p = 0.035$) and less presence of splenomegaly ($p = 0.031$) than *JAK2*^{V617F} carriers. Furthermore, PMF *CALR* mutated patients showed lower frequency of thrombotic events ($p = 0.019$) in comparison with *JAK2*^{V617F} carriers, while C-reactive protein levels

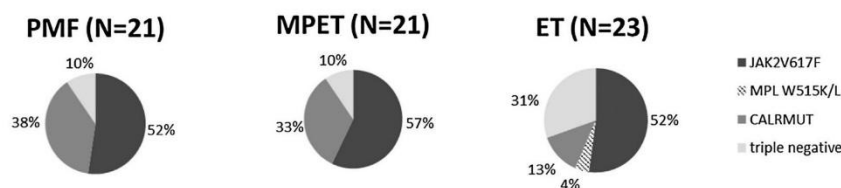


Fig. 1. Frequencies of $JAK2^{V617F}$, $MPL^{W515K/L}$ and $CALR$ mutations in myeloproliferative neoplasms patients. PMF: primary myelofibrosis, MPET: myelofibrosis post-essential thrombocythemia, ET: essential thrombocythemia.

($p = 0.036$) and the presence of splenomegaly ($p = 0.009$) were higher in $CALR$ WT compared with $CALR$ mutation carriers. ET $CALR$ mutant carriers had a higher platelet count ($p = 0.043$) than $JAK2^{V617F}$, and MPET $CALR$ mutant carriers had a higher body mass index ($p = 0.042$) than $JAK2^{V617F}$.

4. Discussion

The discovery of the $JAK2^{V617F}$ mutation in 2005 has clarified some of the molecular bases and has become major molecular diagnosis criteria for MPN [2–5]. The recent discovery of $CALR$ mutations in MPN patients has given a new horizon for the diagnosis and treatment of these diseases [34,35] and may also have implications for risk stratification, management, and prognosis [14,19,36,37].

The frequency of $CALR$ mutations in WT $JAK2^{V617F}$ and $MPL^{W515K/L}$ Brazilian MPN patients was shown in the present study, being according to our knowledge, the first report regarding $CALR$ mutations in Brazil. Clinical and hematological features of $JAK2^{V617F}$ mutated patients were also compared with those of $CALR$ mutant carriers and triple negatives.

$CALR$ gene encodes calreticulin, a protein with several functions, located primarily in the lumen of the endoplasmic reticulum where it performs functions of chaperone. This protein has an important function in calcium homeostasis, acting as a major Ca^{2+} -binding (storage) protein, and it probably has a role in transcription regulation since it is also found in the cellular nucleus [38]. The target genes of calreticulin are still unknown; however, there is evidence for its involvement in apoptosis and cell survival regulation in cancer cells by promotion of macrophage antitumor activity [39]. Mutations in $CALR$ gene result in a novel C-terminal peptide in an endoplasmic reticulum-retention region, and besides that the physiological effects of these alterations are not yet cleared, the first studies suggest a critical implication of STAT5 phosphorylation [11].

The high prevalence of $CALR$ mutations in MPN and the fact that they are present in majority of $JAK2^{V617F}$ negative patients corroborates that at least some of the $CALR$ protein functions overlap with those of janus kinase 2 [13]. $CALR$ has already proven to be useful for MPN diagnostics

and has been recently put up as a candidate for the future WHO diagnostic criteria of MPNs [15,40].

$JAK2^{V617F}$ was the most frequent mutation in our cohort, showing similar frequencies as previously reported [2,5,31]. Furthermore, $CALR$ mutations frequency in MPN patients in this study (27.37%) confirms previous findings in European patients (20–25%) [11,12,41]. These mutations were found in 74% [16] and 88% [11] of PMF WT $JAK2^{V617F}$ patients, while in this study the reported frequency was 80%. Brazilian PMF patients showed higher frequencies of $CALR$ mutations than Chinese [41,42] and Japanese [24] populations. Interestingly, $CALR$ mutation frequencies in ET patients were similar to those reported in a Chinese study [42], but much lower than the frequencies reported by others [11,19,24,41]. It is noteworthy that the Brazilian population has a very diverse genetic background that is the result of more than five centuries of interethnic crossing of people from three continents: European, Amerindian and African [43–46]. Therefore, the discrepancy in $CALR$ mutations frequencies among MPN patients in these studies could be explained by different ethnic backgrounds.

Patients carrying $CALR$ mutations had higher platelet count than $JAK2^{V617F}$. However, when we evaluated each group of disease separately, only ET patients presented this feature. In fact, previous cohort studies showed that PMF and ET patients carrying $CALR$ mutations have higher platelet count than $JAK2^{V617F}$ [14,16,19]. They also showed that $CALR$ mutant carriers have younger age and lower leucocyte count than $JAK2^{V617F}$ counterparts. Although not statistically significant, we observed the same trend in accordance with these statements.

$CALR$ mutations have been associated with better thrombosis-free survival in ET [11,14,18,47] and superior overall survival in PMF [16]. We found lower frequency of thrombotic events in $CALR$ mutated PMF patients compared to the non-mutated ones. This result corroborates the aforementioned studies and suggests a better prognosis for patients with $CALR$ mutations than $JAK2^{V617F}$ carriers.

With regard to splenomegaly, our data are consistent with another study [19] that showed less presence of splenomegaly in ET patients carrying $CALR$ mutations compared to $JAK2^{V617F}$ patients. It was also showed that $CALR$ mutation was associated with lower red blood cell count, hemoglobin and hematocrit in PMF patients, as previously reported [14,16,19,24]. In general, better overall survival in the $CALR$ mutant carrier has been demonstrated in comparison to either $JAK2^{V617F}$ or triple negative patients [16].

Conclusions

These data supports the importance of $JAK2^{V617F}$, $MPL^{W515K/L}$ and $CALR$ mutations profile screening in MPN patients. The identification of one of these molecular markers is very helpful to consolidate an accurate diagnosis of MPN and useful in the prognostic and management of MPN patients. Due to remarkable occurrence, increasingly studies have been performed and new $CALR$ mutations have been described in different populations. In our study we found a new $CALR$ mutation in a PMF patient with severe anemia at diagnosis. The question still remains: What is the role of $CALR$ in the clinical outcome? More clinical and experimental studies are necessary to establish this relationship.

Table 1

$CALR$ mutation distribution among primary myelofibrosis, myelofibrosis post-essential thrombocythemia and essential thrombocythemia patients.

Mutation	Mutation type	PMF (n = 10)	MPET (n = 9)	ET (n = 9)	Total (n = 28)
1092_1143del52	1	4 (40.0)	3 (33.4)	2 (22.2)	9 (32.1)
1154_1155insTTGTG	2	3 (30.0)	3 (33.4)	0	6 (21.4)
1153_1154AA>TGTC	32	0	1 (11.0)	0	1 (3.6)
1122_1140del119	40	0	0	1 (11.1)	1 (3.6)
1125delA ^a	Novel	1 (10.0)	0	0	1 (3.6)
Wild-type	None	2 (20.0)	2 (22.2)	6 (66.7)	10 (35.7)

^a 1125delA is a novel mutation. PMF: primary myelofibrosis, MPET: myelofibrosis post-essential thrombocythemia, ET: essential thrombocythemia. Data are presented as number of subjects (percentage).

Table 2
Clinical and hematological features of myeloproliferative neoplasm patients according to gene mutation status.

Variables	All patients (n = 64)**	<i>CALR</i> mutated (A) (n = 18)	<i>JAK2</i> ^{V617F} mutated (B) (n = 36)	Triple negative (C) (n = 10)	p value (A) vs (B)	p value (B) vs (C)	p value (A) vs (C)
Age (years)	64.5 (54.0–74.0)	61.0 (55.5–73.0)	66.5 (54.0–76.0)	59.5 (39.3–75.3)	0.714*	0.280*	0.401*
Males [†]	27 (42.2)	7 (38.9)	18 (50.0)	2 (20.0)	0.440 [‡]	0.150 [‡]	0.417 [‡]
RBC ($\times 10^9/L$)	4.0 (3.4–4.8)	4.1 (3.3–4.4)	4.1 (3.4–5.1)	3.8 (3.5–4.4)	0.353*	0.557*	0.924*
Hemoglobin (g/dL)	13.2 (11.8–15.0)	12.6 (11.3–14.0)	14.1 (12.2–15.7)	13.4 (11.4–14.9)	0.060*	0.682*	0.314*
Hematocrit (%)	38.8 (35.3–43.7)	36.5 (33.2–41.0)	41.7 (35.4–45.5)	39.4 (33.4–43.6)	0.079*	0.723*	0.250*
WBC ($\times 10^9/L$)	7.5 (5.7–10.6)	7.1 (5.1–8.3)	8.1 (6.0–13.4)	8.8 (4.8–9.5)	0.098*	0.503*	0.325*
Platelets ($\times 10^9/L$)	462 (304–680)	634 (401–811)	385 (270–599)	396 (238–671)	0.032*	0.902*	0.093*
Body mass index (kg/m ²)	24.7 (22.5–27.3)	23.3 (20.6–29.0)	24.2 (22.5–26.0)	27.1 (24.8–31)	0.959*	0.011*	0.084*
C-reactive protein (mg/dL)	0.17 (0.07–0.34)	0.08 (0.04–0.24)	0.17 (0.09–0.32)	0.43 (0.17–0.77)	0.125*	0.064	0.011*
Presence of splenomegaly	14 (21.9)	1 (5.6)	10 (27.8)	3 (30.0)	0.030[‡]	1.000 [§]	0.130 [§]
Weight loss	7 (10.9)	1 (5.6)	5 (13.9)	1 (10.0)	0.651 [¶]	1.000 [§]	1.000 [§]
Thrombotic event	6 (9.4)	1 (5.6)	4 (11.1)	1 (10.0)	0.651 [¶]	1.000 [§]	1.000 [§]
Hypertension	33 (51.6)	6 (33.3)	20 (55.6)	7 (70.0)	0.080 [¶]	0.716 [¶]	0.114 [¶]
Transfusion requiring	5 (7.8)	3 (16.7)	2 (5.6)	0	0.319 [¶]	1.000 [§]	0.533 [¶]

**The patient positive for *MPL*^{W515L} was not included. RBC: red blood cell count, WBC: white blood cell count. Numeric variables are presented as median (P25–P75); (†) Mann–Whitney test was used for comparing groups (A \times B; B \times C and A \times C). Categorical variables are presented as number of subjects (percentage); Chi-square (‡) test or Fisher's exact test (¶) was used to compare the frequencies between groups.

P-values with significant differences are shown in bold (P < 0.05).

Contributors

DPTN and LTL were responsible for the study design, recruitment of participants and data collection, analysis, and drafting, critical revision and final approval of the article.

MM-N and MTDs were responsible for the development of the methods for detection of *JAK2*^{V617F}, *MPLW*^{515K/L} and *CALR* mutations, critical revision, and approval of the final report.

MdLC and MGC were part of the clinical team and were responsible for patient screening and recruitment, data collection, critical revision, and approval of the final report.

EMG-S was responsible for the study design, obtaining funding, coordination of the study, data analysis and critical revision, drafting and approval of the final report.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported financially by FAPESP, Brazil (2012/12957-5). DPTN, LTL and EMGS are recipients of fellowships from CNPq (DPTN: 141564/2012-1; LTL: 141542/2012-8 and EMGS: 311543/2014-6), Brazil. We thank all the patients who participated in this study.

References

- [1] R.L. Levine, Another piece of the myeloproliferative neoplasms puzzle, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 2451–2452.
- [2] C. James, V. Ugo, J.P. Le Couédic, J. Staerk, F. Delhommeau, C. Lacout, L. Garçon, H. Raslova, R. Berger, A. Bennaceur-Griscelli, J.L. Villeval, S.N. Constantinescu, N. Casadevall, W. Vainchenker, A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera, *Nature* 434 (2005) 1144–1148.
- [3] R. Kralovics, F. Passamonti, A.S. Buser, S.S. Teo, R. Tiedt, J.R. Passweg, A. Tichelli, M. Cazzola, R.C. Skoda, A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1779–1790.
- [4] R.L. Levine, M. Wadleigh, J. Coombs, B.L. Ebert, G. Wernig, B.J. Huntly, T.J. Boggon, I. Wlodarska, J.J. Clark, S. Moore, J. Adelsperger, S. Koo, J.C. Lee, S. Gabriel, T. Mercher, A. D'Andrea, S. Fröhling, K. Döhner, P. Marynen, P. Vandenbergh, R.A. Mesa, A. Tefferi, J.D. Griffin, M.J. Eck, W.R. Sellers, M. Meyerson, T.R. Golub, S.J. Lee, D.G. Gilliland, Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis, *Cancer Cell* 7 (2005) 387–397.
- [5] E.J. Baxter, L.M. Scott, P.J. Campbell, C. East, N. Fourouclas, S. Swanton, G.S. Vassiliou, A.J. Bench, E.M. Boyd, N. Curtin, M.A. Scott, W.N. Erber, A.R. Green, C.G. Project, Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders, *Lancet* 365 (2005) 1054–1061.
- [6] L.M. Scott, W. Tong, R.L. Levine, M.A. Scott, P.A. Beer, M.R. Stratton, P.A. Futreal, W.N. Erber, M.F. McMullin, C.N. Harrison, A.J. Warren, D.G. Gilliland, H.F. Lodish, A.R. Green, *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis, *N. Engl. J. Med.* 356 (2007) 459–468.
- [7] D. Pietra, S. Li, A. Brisci, F. Passamonti, E. Rumi, A. Theocharides, M. Ferrari, H. Gisslinger, R. Kralovics, L. Cremonesi, R. Skoda, M. Cazzola, Somatic mutations of *JAK2* exon 12 in patients with *JAK2* (V617F)-negative myeloproliferative disorders, *Blood* 111 (2008) 1686–1689.
- [8] Y. Pikman, B.H. Lee, T. Mercher, E. McDowell, B.L. Ebert, M. Gozo, A. Cuker, G. Wernig, S. Moore, I. Galinsky, D.J. DeAngelo, J.J. Clark, S.J. Lee, T.R. Golub, M. Wadleigh, D.G. Gilliland, R.L. Levine, *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia, *PLoS Med.* 3 (2006) e270.
- [9] A.D. Pardanani, R.L. Levine, T. Lasho, Y. Pikman, R.A. Mesa, M. Wadleigh, D.P. Steensma, M.A. Elliott, A.P. Wolanskyj, W.J. Hogan, R.F. McClure, M.R. Litwack, D.G. Gilliland, A. Tefferi, *MPL515* mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients, *Blood* 108 (2006) 3472–3476.
- [10] P.A. Beer, P.J. Campbell, L.M. Scott, A.J. Bench, W.N. Erber, D. Bareford, B.S. Wilkins, J.T. Reilly, H.C. Hasselbalch, R. Bowman, K. Wheatley, G. Buck, C.N. Harrison, A.R. Green, *MPL* mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort, *Blood* 112 (2008) 141–149.
- [11] T. Klampfl, H. Gisslinger, A.S. Harutyunyan, H. Nivarthi, E. Rumi, J.D. Milosevic, N.C. Them, T. Berg, B. Gisslinger, D. Pietra, D. Chen, G.I. Vladimer, K. Baginski, C. Milanese, I.C. Casetti, E. Sant'Antonio, V. Ferretti, C. Elena, F. Schischlik, C. Cleary, M. Six, M. Schalling, A. Schönegger, C. Bock, L. Malcovati, C. Pascutto, G. Superti-Furga, M. Cazzola, R. Kralovics, Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 2379–2390.
- [12] J. Nangalia, C.E. Massie, E.J. Baxter, F.L. Nice, G. Gundem, D.C. Wedge, E. Avezov, J. Li, K. Kollmann, D.G. Kent, A. Aziz, A.L. Godfrey, J. Hinton, I. Martincorena, P. Van Loo, A.V. Jones, P. Guglielmelli, P. Tarpey, H.P. Harding, J.D. Fitzpatrick, C.T. Goudie, A. Ortmann, S.J. Loughran, K. Raine, D.R. Jones, A.P. Butler, J.W. Teague, S. O'Meara, S. McLaren, M. Bianchi, Y. Silber, D. Dimitropoulou, D. Bloxham, L. Mudie, M. Maddison, B. Robinson, C. Keohane, C. Maclean, K. Hill, K. Orchard, S. Tauro, M.Q. Du, M. Greaves, D. Bowen, B.J. Huntly, C.N. Harrison, N.C. Cross, D. Ron, A.M. Vannucchi, E. Papaemmanuil, P.J. Campbell, A.R. Green, Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 2391–2405.
- [13] M. Cazzola, R. Kralovics, From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms, *Blood* 123 (2014) 3714–3719.
- [14] G. Rotunno, C. Mannarelli, P. Guglielmelli, A. Pacilli, A. Pancrazzi, L. Pieri, T. Fanelli, A. Bosi, A.M. Vannucchi, A.J.P.I.R.S.C.G.I.M.M. Investigators, Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia, *Blood* 123 (2014) 1552–1555.
- [15] A. Tefferi, P. Guglielmelli, T.L. Lasho, G. Rotunno, C. Finke, C. Mannarelli, A.A. Belachew, A. Pancrazzi, E.A. Wassie, R.P. Ketterling, C.A. Hanson, A. Pardanani, A.M. Vannucchi, *CALR* and *ASXL1* mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients, *Leukemia* 28 (2014) 1494–1500.
- [16] A. Tefferi, T.L. Lasho, C.M. Finke, R.A. Knudson, R. Ketterling, C.H. Hanson, M. Maffioli, D. Caramazza, F. Passamonti, A. Pardanani, *CALR* vs *JAK2* vs *MPL*-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons, *Leukemia* 28 (2014) 1472–1477.
- [17] A. Tefferi, E.A. Wassie, T.L. Lasho, C. Finke, A.A. Belachew, R.P. Ketterling, C.A. Hanson, A. Pardanani, N. Gangat, A.P. Wolanskyj, Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia, *Leukemia* 28 (2014) 2300–2303.
- [18] E. Rumi, D. Pietra, C. Pascutto, P. Guglielmelli, A. Martínez-Trillos, I. Casetti, D. Colomer, L. Pieri, M. Pratoronca, G. Rotunno, E. Sant'Antonio, M. Bellini, C. Cavalloni, C. Mannarelli, C. Milanese, E. Boveri, V. Ferretti, C. Astori, V. Rosti, F. Cervantes, G. Barosi, A.M. Vannucchi, M. Cazzola, A.J.P.I.R.S.C.G.I.M.M. Investigators, Clinical effect of driver mutations of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* in primary myelofibrosis, *Blood* 124 (2014) 1062–1069.

- [19] E. Rumi, D. Pietra, V. Ferretti, T. Klampfl, A.S. Harutyunyan, J.D. Milosevic, N.C. Them, T. Berg, C. Elena, I.C. Casetti, C. Milanesi, E. Sant'antonio, M. Bellini, E. Fugazza, M.C. Renna, E. Boveri, C. Astori, C. Pascutto, R. Kralovics, M. Cazzola, A.I.P.I.R.S.C.G.I.M.M. Investigators, JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes, *Blood* 123 (2014) 1544–1551.
- [20] J. Chi, M. Manoloukos, C. Pierides, V. Nicolaidou, K. Nicolaou, M. Kleopa, G. Vassiliou, P. Costeas, Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms and new methodology for their detection and monitoring, *Ann. Hematol.* 94 (2015) 399–408.
- [21] J.S. Ha, Y.K. Kim, Calreticulin exon 9 mutations in myeloproliferative neoplasms, *Ann. Lab. Med.* 35 (2015) 22–27.
- [22] É. Pósfai, I. Marton, P.A. Király, B. Kotosz, Z. Kiss-László, M. Széll, Z. Borbényi, JAK2 V617F, MPL, and CALR mutations in essential thrombocythemia and major thrombotic complications: a single-institute retrospective analysis, *Pathol. Oncol. Res.* 21 (3) (2015) 751–758.
- [23] M.C. Finazzi, A. Carobbio, F. Cervantes, I.M. Isola, A.M. Vannucchi, P. Guglielmelli, A. Rambaldi, G. Finazzi, G. Barosi, T. Barbui, CALR mutation, MPL mutation and triple negativity identify patients with the lowest vascular risk in primary myelofibrosis, *Leukemia* 29 (5) (2015) 1209–1210.
- [24] S. Shirane, M. Araki, S. Morishita, Y. Edaishi, H. Takei, Y. Yoo, M. Choi, Y. Sunami, Y. Hironaka, M. Noguchi, M. Koike, N. Noda, A. Ohsaka, N. Komatsu, JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms, *Haematologica* 100 (2015) e46–e48.
- [25] J. Broséus, J.H. Park, S. Carillo, S. Hermouet, F. Girodon, Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera, *Blood* 124 (2014) 3964–3966.
- [26] J. Broséus, E. Lippert, A.S. Harutyunyan, S. Jeromin, E. Zipperer, L. Florensa, J.D. Milosevic, T. Haferlach, U. Germing, E. Luño, S. Schnittger, R. Kralovics, F. Girodon, Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis, *Leukemia* 28 (2014) 1374–1376.
- [27] L. Zamora, B. Xicoy, M. Cabezon, C. Fernandez, S. Marcé, P. Velez, M. Xandri, D. Gallardo, F. Millá, E. Feliu, C. Boqué, Co-existence of JAK2 V617F and CALR mutations in primary myelofibrosis, *Leuk. Lymphoma* (2015) 1–6.
- [28] P. Lundberg, A. Karow, R. Nienhold, R. Looser, H. Hao-Shen, I. Nissen, S. Girsberger, T. Lehmann, J. Passweg, M. Stern, C. Beisel, R. Kralovics, R.C. Skoda, Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms, *Blood* 123 (2014) 2220–2228.
- [29] G. McGaffin, K. Harper, D. Stirling, L. McIntock, JAK2 V617F and CALR mutations are not mutually exclusive; findings from retrospective analysis of a small patient cohort, *Br. J. Haematol.* 167 (2014) 276–278.
- [30] N. Xu, L. Ding, C. Yin, X. Zhou, L. Li, Y. Li, Q. Lu, X.L. Liu, A report on the co-occurrence of JAK2V617F and CALR mutations in myeloproliferative neoplasm patients, *Ann. Hematol.* 94 (5) (2014) 865–867.
- [31] S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J. Vardiman, WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon, 2008.
- [32] G. Barosi, R.A. Mesa, J. Thiele, F. Cervantes, P.J. Campbell, S. Verstovsek, B. Dupriez, R.L. Levine, F. Passamonti, J. Gotlib, J.T. Reilly, A.M. Vannucchi, C.A. Hanson, L.A. Solberg, A. Orazi, A. Tefferi, I.W.G.I.M.R.a.T. (IWG-MRT), Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment, *Leukemia* 22 (2008) 437–438.
- [33] M.T. dos Santos, M. Mitne-Neto, K. Miyashiro, M.E.L. Chauffaille, E.G. Rizzatti, Molecular genetic tests for JAK2V617F, Exon12_JAK2 and MPLW515K/L are highly informative in the evaluation of patients suspected to have BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms, *J. Clin. Pathol.* 67 (2014) 176–178.
- [34] P. Guglielmelli, N. Bartalucci, G. Rotunno, A.M. Vannucchi, Calreticulin: a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms, *Expert. Rev. Hematol.* 7 (2014) 423–425.
- [35] A. Tefferi, A. Pardanani, Genetics: CALR mutations and a new diagnostic algorithm for MPN, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11 (2014) 125–126.
- [36] A. Tefferi, T.L. Lasho, C. Finke, A.A. Belachew, E.A. Wassie, R.P. Ketterling, C.A. Hanson, A. Pardanani, Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact, *Leukemia* 28 (2014) 1568–1570.
- [37] H. Andrikovics, T. Krahling, K. Balassa, G. Halm, A. Bors, M. Koszarska, A. Batai, J. Dolgos, J. Csomor, M. Egyed, A. Sipos, P. Remenyi, A. Tordai, T. Masszi, Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations, *Haematologica* 99 (2014) 1184–1190.
- [38] K. Burns, B. Duggan, E.A. Atkinson, K.S. Famulski, M. Nemer, R.C. Bleackley, M. Michalak, Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor, *Nature* 367 (1994) 476–480.
- [39] M.P. Chao, S. Jaiswal, R. Weissman-Tsukamoto, A.A. Alizadeh, A.J. Gentles, J. Volkmer, K. Weiskopf, S.B. Willingham, T. Raveh, C.Y. Park, R. Majeti, I.L. Weissman, Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47, *Sci. Transl. Med.* 2 (2010) 63ra94.
- [40] K. Haslam, S.E. Langabeer, Considerations and recommendations for a new molecular diagnostic algorithm for the myeloproliferative neoplasms, *Genet. Test. Mol. Biomark.* 18 (11) (2014) 749–753.
- [41] C. Qiao, C. Sun, Y. Ouyang, J.J. Wang, S.X. Qian, J.Y. Li, S.J. Zhang, Clinical importance of different calreticulin gene mutation types in wild-type JAK2 essential thrombocythemia and myelofibrosis patients, *Haematologica* 99 (2014) e182–e184.
- [42] Z. Wu, X. Zhang, X. Xu, Y. Chen, T. Hu, Z. Kang, S. Li, H. Wang, W. Liu, X. Ma, M. Guan, The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms, *J. Hematol. Oncol.* 7 (2014) 48.
- [43] F.C. Parra, R.C. Amado, J.R. Lambertucci, J. Rocha, C.M. Antunes, S.D. Pena, Color and genomic ancestry in Brazilians, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 177–182.
- [44] S.D. Pena, L. Bastos-Rodrigues, J.R. Pimenta, S.P. Bydlowski, DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 (2009) 870–876.
- [45] S.D. Pena, G. Di Pietro, M. Fuchshuber-Moraes, J.P. Genro, M.H. Hutz, F.e.S. Kehdy, F. Kohlrusch, L.A. Magno, R.C. Montenegro, M.O. Moraes, M.E. de Moraes, M.R. de Moraes, E.B. Ojopi, J.A. Perini, C. Racciopi, A.K. Ribeiro-Dos-Santos, F. Rios-Santos, M.A. Romano-Silva, V.A. Sortica, G. Suarez-Kurtz, F. Rios-Santos, M.A. Romano-Silva, V.A. Sortica, G. Suarez-Kurtz, The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected, *PLoS One* 6 (2011) e17063.
- [46] S.R. Giolo, J.M. Soler, S.C. Greenway, M.A. Almeida, M. de Andrade, J.G. Seidman, C.E. Seidman, J.E. Krieger, A.C. Pereira, Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture, *Eur. J. Hum. Genet.* 20 (2012) 111–116.
- [47] N. Gangat, E.A. Wassie, T.L. Lasho, C. Finke, R.P. Ketterling, C.A. Hanson, A. Pardanani, A.P. Wolanskyj, M. Maffioli, R. Casalone, F. Passamonti, A. Tefferi, Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia: prognostic interaction with age and thrombosis history, *Eur. J. Haematol.* 94 (2015) 31–36.

ANEXO I. Artigo submetido no periódico **Journal of Clinical Pathology**

Journal of Clinical Pathology

Journal of
Clinical Pathology**Mutational status in myelofibrosis and essential thrombocythemia patients is associated with differential levels of MMPs, TIMPs, VEGFA and bFGF**

Journal:	<i>Journal of Clinical Pathology</i>
Manuscript ID	jclinpath-2016-203646
Article Type:	Short Report
Date Submitted by the Author:	25-Jan-2016
Complete List of Authors:	de Lima, Luciene; Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Análises Clínicas e Toxicológicas Teixeira Nunes, Daniela; Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Análises Clínicas e Toxicológicas Gomes, Guilherme; Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Análises Clínicas e Toxicológicas Chauffaille, Maria ; Universidade Federal de São Paulo, Hematologia e Hemoterapia Silva, Maria Regina; Universidade Federal de São Paulo, Patologia Ponce, César; Universidade Federal de São Paulo, Patologia Mitne-Neto, Miguel; Grupo Fleury, Pesquisa e Desenvolvimento Santos, Marcos; Grupo Fleury, Pesquisa e desenvolvimento Cliquet, Marcelo; Universidade Católica de São Paulo, Complexo Hospitalar de Sorocaba, Hematologia de Castro, Fabiola; Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas Guerra Shinohara, Elvira; Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Análises Clínicas e Toxicológicas
Keywords:	MYELOPROLIFERATIVE DISEASE, ANGIOGENESIS, PROTEINS
Specialty:	Haematology

SCHOLARONE™
Manuscripts<https://mc.manuscriptcentral.com/jclinpathol>

1
2
3 **Mutational status in myelofibrosis and essential thrombocythemia patients is**
4 **associated with differential levels of MMPs, TIMPs, VEGFA and bFGF**
5
6

7 **Contact information for correspondence:**

8 Elvira Maria Guerra-Shinohara

9 Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

10 Av. Prof. Lineu Prestes, 580. Bloco 17, sala 113.

11 CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

12 Phone: +55 11 3091 3785

13 E-mail: emguerra@usp.br

14
15
16
17
18 Luciene Terezina de Lima¹, Daniela Prudente Teixeira Nunes¹, Guilherme Wataru Gomes¹,
19 Maria de Lourdes Chauffaille², Maria Regina Régis Silva³, Cesar Cilentto Ponce³, Miguel Mitne-
20 Neto⁴, Marcos Tadeu dos Santos⁴, Marcelo Gil Cliquet⁵, Fabíola Attié de Castro⁵, and Elvira
21 Maria Guerra-Shinohara¹

22 LTL and OPTN contributed equally to this study

23
24
25
26
27 ¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
28 Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Departamento de Hematologia e Hemoterapia,
29 Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Departamento de Patologia,
30 Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴Grupo Fleury,
31 Pesquisa e Desenvolvimento, São Paulo, Brazil; ⁵Departamento de Hematologia, Complexo
32 Hospitalar de Sorocaba, Universidade Católica de São Paulo, Sorocaba, Brazil and
33 ⁶Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências
34 Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

35
36
37
38
39
40 **Keywords:** myeloproliferative neoplasms, matrix metalloproteinases, calreticulin, JAK2^{V617F}.

41
42
43 **Text wordcount:** 1493

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

CALR mutations have become a valuable molecular biomarker of diagnosis for myelofibrosis (MF) and essential thrombocythemia (ET) patients lacking *JAK2*^{V617F} and *MPL*^{V515L}. However, the role of *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasm (MPN) pathogenesis remains unclear. Here, we investigated the potential relationships among angiogenic biomarkers levels, Ph-negative MPNs, and mutational status. Serum levels of matrix metalloproteinases (MMPs), their tissue inhibitors (TIMPs), and VEGFA and bFGF plasma levels were evaluated in 65 MPN patients: 21 MF, 21 MF-post-ET (MF-PET) and 23 ET. *JAK2*^{V617F} mutated patients comprised: 52% of PMF, 57% of MF-PET and 52% of ET. One ET patient had a *MPL*^{V515L} mutation. *CALR* mutations were detected in 38% of PMF, 33% of MF-PET and 13% of ET patients. We found reduced MMP9 levels in PMF *CALR* mutated compared with *JAK2*^{V617F} patients. MF-PET *CALR* mutated patients presented lower levels of MMP9, TIMP2, VEGFA and bFGF than *JAK2*^{V617F} patients. ET triple-negative patients had lower MMP2 and TIMP2 levels in comparison with *JAK2*^{V617F} patients. Taken together, the results indicate an association between MPN patient mutational status and angiogenic biomarkers, and suggest that *JAK2*^{V617F} carriers present an aggressive disease progression.

INTRODUCTION

Since the discovery of the *JAK2*^{V617F} mutation,[1-4] which is detected in more than 95% of polycythemia vera (PV) and about 55% of primary myelofibrosis (PMF) and essential thrombocythemia (ET) cases, researchers have tried to elucidate the genetic basis of myeloproliferative neoplasms (MPN) in *JAK2* wild type (WT) carriers. The identification of *CALR* exon 9 mutations in the majority of PMF and ET patients who lack *JAK2* and *MPL* mutations[5-8] bridged this gap, identifying a novel molecular marker for these diseases. Clinical and hematological features of PMF and ET patients, according to mutational status, have been extensively studied.[5-8] However, the mechanisms involved in hematopoietic cell cytokine-independent signaling activation and the impact of *CALR* mutations on MPN pathogenesis remain unclear.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are proteolytic, zinc-dependent enzymes capable of degrading extracellular matrix (ECM) components. Their activity is regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs).[9] Deregulated MMP functions have been implicated in tumor progression due to promotion of cell growth, immune function modulation, tumor cell invasion, metastasis, and release of VEGFA and bFGF angiogenic factors. High MMP2 and MMP9 expression has been associated with fibrotic and angiogenic processes in Ph-negative MPNs.[10]

Here, we evaluated *JAK2*^{V617F}, *MPL*^{W515K/L} and *CALR* mutations and investigated their potential association with angiogenic biomarker levels which participate in MPN pathogenesis, i.e., MMPs, TIMPs, VEGFA, and bFGF.

PATIENTS AND METHODS

PATIENTS

This study enrolled 65 patients: 21 PMF and 23 ET diagnosed according to World Health Organization (WHO) 2008 criteria[11] and 21 myelofibrosis post-essential thrombocythemia (MF-PET) diagnosed according to the International Working Group for MPN Research and Treatment (IWG-MRT).[12] Patients were receiving regular follow-up at the Hematology clinical practice of Universidade Federal de São Paulo, and the Universidade

1
2
3 Católica de São Paulo, Sorocaba, Brazil between 2013 to 2014. Patients with infections, fungal,
4 bacterial or viral diseases were excluded from this study. This research was approved by the
5 Institutional Ethics Committee of the both Universities. All participants provided a signed
6 informed consent. Clinical data and laboratory parameters were obtained at the time of
7 diagnosis or when peripheral blood samples were collected.
8
9

10 11 12 13 14 *JAK2*^{V617F}, *MPL*^{W515K/L} AND *CALR* MUTATIONS DETECTION

15 Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using QIAamp Blood Mini
16 Kit (PreAnalytik/ Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.
17 Screening for *JAK2*^{V617F} (and quantitation of its allelic burden) and *MPL*^{W515K/L} were performed
18 using TaqMan-based real-time PCR as previously described.[13] *JAK2*^{V617F} non-mutated
19 samples were analyzed for *MPL*^{W515K/L} and those *MPL* WT were further analyzed for *CALR*
20 mutations. *CALR* exon 9 mutations were examined by fragment analysis and confirmed by
21 Sanger sequencing as previously described.[14] Patients who lacked *JAK2*^{V617F}, *MPL* or *CALR*
22 mutations were considered triple-negative.
23
24
25
26
27
28
29
30

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60

PROTEIN LEVELS OF MMP-2, MMP-9, TIMP1 AND TIMP2, VEGFA AND bFGF

Serum levels of MMP2 and MMP9 (HMMP2MAG-55K-02); TIMP1 and TIMP2
(HTMP1MAG-54-02) and plasma levels of VEGFA and bFGF (HAGPIMAG-12K-02) were
measured using LuminexX-MAP technology as described by the manufacturer.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis were carried out using SPSS version 17.0 (IBM, USA) and
GraphPad Prism™ version 6.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) software. P-values less
than 0.05 were considered significant. Categorical variables have been summarized by the
number of patients and percentage (%), and numerical variables by their median and
interquartile range. Allele burden results were presented as the median of percentage of
mutated alleles. Mann-Whitney test was used for continuous variables, while for categorical
variables the Chi-Square and Fisher's exact test were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Patient groups had no differences in age, gender, blood counts and frequency of mutations. *JAK2*^{V617F} frequency was: 52.4% (N=11) in PMF, 57.1% (N=12) in MF-PET and 56.5% (N=13) in ET. *JAK2*^{V617F} allele burden median was 25% in PMF, 10% in MF-PET and 9% in ET patients, and no difference was found among the three groups (P=0.888). Only one ET patient presented *MPL*^{W515L}. *CALR* mutations were detected in 38.1% (N=8) of PMF, 33% (N=7) of MF-PET and 13% (N=3) of ET patients (Table 1).

Table 1. Hematologic data, clinical features and mutational status of PMF, MF-PET and ET patients

Variables	PMF (N=21)	MF-PET (N=21)	ET (N=23)	P-value
Age (years)	62 (56-78)	66 (54-75)	66 (49-73)	0.622
Males/Females	10/11 (48/52)	8/13 (38/62)	9/14 (39/61)	0.751
Duration of disease from diagnosis (months)	29 (5-83)	26 (16-56)	64 (24-98)	0.184
Hemoglobin (g/L)	12.2 (10.1-15.5)	13.3 (12.5-15.1)	13.8 (12.3-14.9)	0.296
WBC (x10 ⁹ /L)	7.5 (5.7-13.1)	8.2 (5.1-10.9)	7.4 (5.8-9.9)	0.994
Platelets (x10 ⁹ /L)	423 (108-711)	430 (235-651)	540 (361-688)	0.347
<i>JAK2</i> ^{V617F}	11 (52.4)	12 (57.1)	13 (56.5)	0.952
<i>JAK2</i> ^{V617F} allele burden (%)	25 (9-39)	10 (9-57)	9 (9-23)	0.888
<i>MPL</i> ^{W515L}	0 (0)	0 (0)	1 (4.3)	
<i>CALR</i> mutation	8 (38.1)	7 (17.5)	3 (13%)	0.064

WBC: white blood cells. Categorical variables are presented as number of subjects (percentage). Numerical variables are presented as median (P25-P75). Categorical variables are presented by the number of subjects and percentage (%), and numerical variables by their median and interquartile range. Allele burden results are presented as the median of percentage of mutated alleles. Kruskal-Wallis test used for continuous variables and Chi-Square and Fisher's exact test for categorical variables were performed by using SPSS 17.0 (IBM, USA) software. P-values less than 0.05 were considered significant.

Type 1 mutation (52-bp deletion; c.1092_1143del) was the most frequent among *CALR* mutated patients, being found in 40% (N=4) of PMF, 33% (N=3) of MF-PET and 22% (N=2) of ET, while 30% (N=3) of PMF, 33% (N=3) of MF-PET and none of ET patients had type 2 mutation (5-bp insertion; c.1154_1155insTTGTC).

In the present work, we hypothesized that serum levels of MMPs and TIMPs and plasma levels of angiogenic factors could be driven by the MPN genotype. Thus, we compared protein levels according to mutational status for each MPN (Figure 1). PMF patients harboring *JAK2*^{V617F} (N=11) had significantly higher MMP9 levels compared with *CALR* mutated patients

1
2
3 (N=8) (158.3 vs 55.8 ng/mL; P=0.020; Figure 1 B). MF-PET $JAK2^{V617F}$ patients (N=12) had
4 higher levels of MMP9 (131.0 vs 84.5 ng/mL; P=0.047; Figure 1 H), TIMP2 (119.8 vs 103.3
5 ng/mL; P=0.047; Figure 1 J), VEGFA (139.0 vs 11.16 pg/mL; P=0.005; Figure 1 K) and bFGF
6 (21.5 vs 6.6 pg/mL; P=0.023; Figure 1 L) compared with *CALR* mutated subjects (N=8). Due to
7 the small number of ET *CALR* mutated patients (N=3), we compared protein levels between
8 $JAK2^{V617F}$ and triple-negative patients. ET triple-negative patients (N=6) had lower MMP2 (122.4
9 vs 156.6 ng/mL; P=0.043; Figure 1 M) and TIMP2 levels (97.5 vs 108.4 ng/mL; P=0.017; Figure
10 1 P) in comparison with $JAK2^{V617F}$ patients (N=12). A trend increase of VEGFA and bFGF was
11 noted in PMF and ET patients (Figure 1 E, F, Q and R).

12
13
14
15
16
17
18
19 Although $JAK2^{V617F}$ positive patients had, in general, higher levels of MMPs, TIMPs,
20 VEGFA and bFGF, no correlation was found between protein levels and $JAK2^{V617F}$ allele burden
21 (P>0.05). Our data comparing mutational status with levels of these proteins is in an agreement
22 with a previous study that found higher TIMP1 and TIMP2 protein levels in PMF and ET
23 $JAK2^{V617F}$ positive patients, respectively; however, $JAK2^{V617F}$ allele burden was not evaluated in
24 that study.[15]

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Comparison of clinical and laboratory parameters between *JAK2* and *CALR*-mutated patients revealed that *CALR* mutated patients had higher platelet counts, lower frequency of splenomegaly,[14] lower hemoglobin concentrations and leukocyte counts, and lower risk for thrombosis,[5-8] which are related to a favorable prognosis, but they did not have a different rate of progression to MF-PET.[16]

Ph-negative MPNs are characterized by bone marrow stroma remodeling, likely as a consequence of disturbed synthesis and turnover of collagen fibers, resulting in bone marrow hematopoietic displacement by fibrotic tissue, angiogenesis and osteosclerosis.[17] The higher levels of MMPs, TIMPs and angiogenic markers in $JAK2^{V617F}$ MPN patients indicate the influence of these proteins in the bone marrow microenvironment and stroma. The relationship between MMPs and *CALR* was described by Wu and co-authors[18] They found that MMP9 protein levels were decreased in *CALR*^{-/-} embryonic fibroblast cells when compared to WT cells, while no changes were observed in TIMP1, TIMP2 and MMP2 protein levels.[18]

We show that MMP2, MMP9, TIMP2, VEGFA and bFGF levels are decreased in *CALR* mutated MPN patients. This could be explained, at least in part, by the fact that *CALR* exon 9

1
2
3 mutations promote a frameshift resulting in loss of most of the acidic domain, including the
4 KDEL signal. The changes create a novel C-terminus protein, responsible for chaperones that
5 retrieve proteins from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum (ER). A mutated novel C-
6 terminus has been suggested to disrupt the ER-signaling peptide and influence CALR
7 subcellular localization, stability, and function, or any combination of these. However, studies of
8 myeloid cells from CALR mutated patients showed that mutant CALR largely retains its
9 localization within the ER.[5 6]

10
11 In summary, we show that CALR mutated and triple-negative MPN patients exhibit
12 lower levels of the studied proteins involved in angiogenesis compared with JAK2^{V617F} mutated
13 counterparts, providing some insight into their role in the MPN disease phenotype. Decreased
14 levels of angiogenic proteins in CALR mutated and triple-negative patients may contribute to a
15 less aggressive course of the disease compared to JAK2^{V617F} mutated patients.

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28 **Authorship contributions:** LTL and DPTN conceived the idea, designed the study, recruited
29 and collected the blood of the participants, performed the experiments, analyzed and
30 interpreted data and wrote the manuscript. GWG processed the blood. MM-N and MTdS were
31 responsible for the development of the methods for detection of JAK2^{V617F}, MPL^{V515K/L} and
32 CALR mutations. MdLC, MGC, MRRS and CCP were part of the clinical team responsible for
33 patient diagnosis and screening, recruitment and data collection. FAC contributed to writing the
34 article and provided some reagent. EMG-S conceived the idea and designed the study,
35 obtained funding, coordinated the study, data analysis and critical revision. All authors reviewed
36 and approved the manuscript.

37
38
39
40
41
42
43
44
45 **Acknowledgments:** This study was financially supported by FAPESP, Brazil (#2012/12957-5).
46 LTL, DPTN, GWG, FAC and EMGS have received fellowships from CNPq, Brazil (LTL:
47 141542/2012-8; DPTN: 141564/2012-1; GWG: 132851/2014-8; FAC 311236/2012-0 and
48 EMGS: 311543/2014-6). Currently, LTL is also supported by a doctoral sandwich fellowship at
49 University of Utah, USA from the CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil. We thank
50 all the patients who participated in this study. We also thank Dr. Joseph T. Prochal, from the
51 University of Utah, for the critical revision of the manuscript.

1
2
3
4
5 **Conflict of interest disclosures:** The authors declare no competing financial interests.
6
7

8
9 **References**

- 10 1. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive
11 signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-8 doi:
12 10.1038/nature03546.
- 13 2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in
14 human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365(9484):1054-61 doi:
15 10.1016/S0140-6736(05)71142-9.
- 16 3. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in
17 polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with
18 myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387-97 doi: 10.1016/j.ccr.2005.03.023.
- 19 4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in
20 myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-90 doi:
21 10.1056/NEJMoa051113.
- 22 5. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative
23 neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391-405 doi:
24 10.1056/NEJMoa1312542.
- 25 6. Klampff T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in
26 myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379-90 doi:
27 10.1056/NEJMoa1311347.
- 28 7. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and
29 hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*
30 2014;123(10):1552-5 doi: 10.1182/blood-2013-11-538983.
- 31 8. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of
32 essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes.
33 *Blood* 2014;123(10):1544-51 doi: 10.1182/blood-2013-11-539098.
- 34 9. Chaudhary AK, Pandya S, Ghosh K, et al. Matrix metalloproteinase and its drug targets
35 therapy in solid and hematological malignancies: An overview. *Mutat Res*
36 2013;753(1):7-23 doi: 10.1016/j.mrrev.2013.01.002.
- 37 10. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface
38 transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim*
39 *Biophys Acta* 2012;1825(1):29-36 doi: 10.1016/j.bbcan.2011.10.001.
- 40 11. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization
41 (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important
42 changes. *Blood* 2009;114(5):937-51 doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
- 43 12. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia
44 vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-
45 ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international
46 working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res*
47 2007;31(8):737-40 doi: 10.1016/j.leukres.2006.12.002.
- 48 13. dos Santos MT, Mitne-Neto M, Miyashiro K, et al. Molecular genetic tests for JAK2V617F,
49 Exon12_JAK2 and MPLW515K/L are highly informative in the evaluation of patients
50 suspected to have BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol*
51 2014;67(2):178-8 doi: 10.1136/jclinpath-2013-201822.
- 52 14. Nunes DP, de Lima LT, Chauffaille ML, et al. CALR mutations screening in wild type
53 JAK2(V617F) and MPL(W515K/L) Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. *Blood*
54 *Cells Mol Dis* 2015;55(3):238-40 doi: 10.1016/j.bcmd.2015.07.005.
- 55 15. Vadikolia CM, Tsatalas C, Anagnostopoulos K, et al. Proteolytic matrix metalloproteinases
56 and inhibitors in BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms: correlation with
57 JAK2 mutation status. *Acta Haematol* 2011;126(1):54-62 doi: 10.1159/000324436.
- 58 16. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on
59 diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2015;90(2):162-73 doi:
60 10.1002/ajh.23895.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

17. Tripodo C, Sangaletti S, Piccaluga PP, et al. The bone marrow stroma in hematological neoplasms-a guilty bystander. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2011;8(8):456-86 doi: 10.1038/nrclinonc.2011.31.

18. Wu M, Massaelli H, Durston M, et al. Differential expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the calreticulin deficient cells. *Matrix Biol* 2007;26(8):463-72 doi: 10.1016/j.matbio.2007.02.005.

Confidential: For Review Only

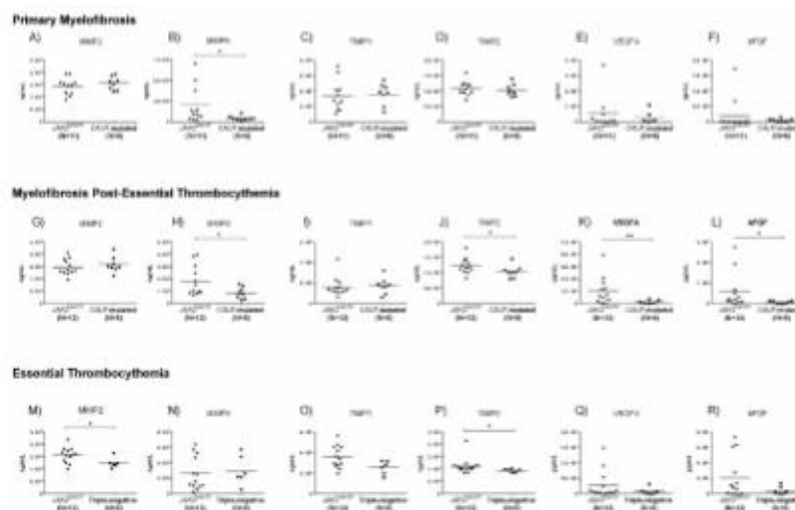


Figure 1. Serum MMP2, MMP9, TIMP1 and TIMP2 and plasma VEGFA and bFGF levels in MPN patients according to mutational status. The medians of protein levels between the groups were compared by the Mann-Whitney test by using GraphPad Prism™ 6.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). The horizontal lines represent the medians of protein levels for each group. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.
436x277mm (300 x 300 DPI)

Anexo J. Avaliação do orientador no exteriorUNIVERSITY OF UTAH
HEALTH CAREDivision of Hematology &
Hematologic Malignancies

January 12, 2016

Re: Luciene de Lima

The Capes Foundation,
Ministry of Education of Brazil.
Cx. postal 250
Brasília DF 70.040-020
Brazil

To whom may concern,

It is a great pleasure to write an outstanding evaluation for Ms. Luciene de Lima, who is a PhD student in Brazil in São Paulo. Ms. de Lima worked in my laboratory at the University of Utah School of Medicine from November 1, 2014 to October 31, 2015

She was highly recommended by her mentor and, in point of fact, I wholeheartedly agree based on my experience with her during her stay in Utah.

Luciene would be an exceptional PhD student in the United States. She is hard working, able to read and critically evaluate literature, had some original ideas, learned extremely fast, and is quite ambitious. I am certain she will do well in the future after she finishes her pending PhD dissertation. While in our laboratory, she participated in several projects. She played a major role in our study of a large number of patients with calreticulin and JAK2 mutations and essential thrombocythemia, and evaluated the presence or absence of clonal hematopoiesis using X-chromosome inactivation. This work has been published in a prestigious journal *Leukemia*.

Luciene has also been working on expression of metalloproteinases in myeloproliferative neoplasms, including polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis. I have been impressed with the high quality of the data she generated, and these data are now being prepared for publication.

In summary, Ms. de Lima is a PhD student who should have no trouble graduating with high honors from her university. I was very honored and pleased that she spent a year in my laboratory.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Prchal'.

Josef T. Prchal, M.D.
The Charles A. Nugent, M.D., and Margaret Nugent Endowed Chair
Professor of Medicine, Pathology and Genetics

School of Medicine
30 North 1900 East, Room 5C402
Salt Lake City, Utah 84132-2408
Phone 801-585-3229
Fax 801-585-3432